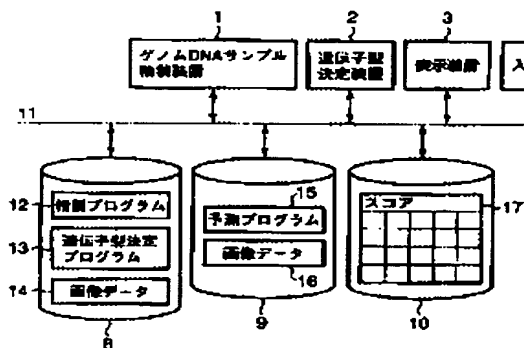


A

L1 ANSWER 1 OF 1 WPINDEX COPYRIGHT 2006 THE THOMSON CORP on STN
 AN 2003-601347 [57] WPINDEX
 DNN N2003-479123 DNC C2003-163712
 TI New gene polymorphism such as c.705 G-T, IVS14-30 C-T or c.132(GT)-(12-18)
 in human CD19 gene, or c.695 T-C in human FCGR2B, useful for determining
 risk of incidence of systemic lupus erythematosus.
 DC B04 D16 T01
 PA (OLYU) OLYMPUS OPTICAL CO LTD
 CYC 1
 PI JP 2003061677 A 20030304 (200357)* 41 C12N015-09 <--
 ADT JP 2003061677 A JP 2001-258494 20010828
 PRAI JP 2001-258494 20010828
 IC ICM C12N015-09
 ICS C12M001-00; C12Q001-68; G06F019-00
 SLE発症危険率予測装置の構成



AB JP2003061677 A UPAB: 20030906
 NOVELTY - New gene polymorphism chosen from c.705 G-T in a human CD19
 gene, IVS14-30 C-T in human CD19 gene, c. asterisk 132(GT)12-18 in human
 CD19 gene, and c.695 T-C in human FCGR2B, is new.
 DETAILED DESCRIPTION - INDEPENDENT CLAIMS are included for the
 following:
 (1) determining risk of incidence of systemic lupus erythematosus
 (SLE) in an organism, by identifying the above mentioned polymorphisms in
 the genomic DNA sample of the organisms;
 (2) apparatus for determining risk of incidence of SLE in an organism
 using computer, comprises an unit (1) for purifying genomic DNA, unit (2)
 for determining genotype of an organism, memory unit (6), and an output
 unit (4);
 (3) computer program for performing the method of determining risk of
 incidence of SLE in an organism;
 (4) polynucleotide sequences (I) having a fully defined sequence
 (S1-S8) of 8743, 252, 258, 260, 262, 268, 369 or 567 nucleotides as given
 in the specification;
 (5) fragment of (S1) containing at least 10-30 contiguous bases of
 nucleotides 2553-8518 of (S1);
 (6) fragment of (S5) containing at least 15-30 contiguous bases of
 nucleotides 194-223 of (S5);
 (7) fragment of (S6) containing at least 18-30 contiguous bases of
 nucleotides 194-229 of (S5);
 (8) fragment of (S7) containing at least 7-30 contiguous bases of
 nucleotides 7-304 of (S7);
 (9) fragment of (S8) containing at least 15-30 contiguous bases of
 nucleotides 8-386 of (S8); and
 (10) a polynucleotide having the sequence of cccaactttgtcagcctcat.
 USE - The gene polymorphisms are useful for determining the risk of
 incidence of systemic lupus erythematosus in a subject.
 ADVANTAGE - The method is highly sensitive in detecting systemic
 lupus erythematosus.
 DESCRIPTION OF DRAWING(S) - The figure shows the block diagram of an
 apparatus for determining risk of incidence of systemic lupus
 erythematosus in a subject. (Drawing includes non-English language text).
 unit for purifying genomic DNA 1
 unit for determining genotype of an organism 2
 output unit 4

BEST AVAILABLE COPY

memory unit 6

Dwg.1/8

FS CPI EPI

FA AB; GI; DCN

MC CPI: B04-E01; B04-E09; B11-C08E5; B11-C08F2; B12-K04A; B12-K04F; D05-H09;
D05-H12A

EPI: T01-J

A

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2003-61677

(P2003-61677A)

(43) 公開日 平成15年3月4日 (2003.3.4)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 M 1/00	A 4 B 0 2 4
C 1 2 M 1/00		C 1 2 Q 1/68	A 4 B 0 2 9
C 1 2 Q 1/68		G 0 6 F 19/00	1 0 0 4 B 0 6 3
G 0 6 F 19/00	1 0 0	C 1 2 N 15/00	Z N A A

審査請求 未請求 請求項の数15 O L (全 41 頁)

(21) 出願番号 特願2001-258494(P2001-258494)

(22) 出願日 平成13年8月28日 (2001.8.28)

(71) 出願人 000000376

オリンパス光学工業株式会社

東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号

(72) 発明者 徳永 勝士

東京都中野区中央1-23-2

(72) 発明者 土屋 尚之

東京都文京区本郷6-11-8-204

(74) 代理人 100058479

弁理士 鈴江 武彦 (外4名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 全身性エリテマトーデスの感受性遺伝子およびその使用

(57) 【要約】

【課題】 全身性エリテマトーデスの感受性遺伝子、この感受性遺伝子を用いて全身性エリテマトーデスの発症危険率を予測する方法および装置を提供する。

【解決手段】 以下の群より選択される新規多型遺伝子：

(1) ヒトCD19遺伝子におけるc. 705G>T；

(2) ヒトCD19遺伝子におけるIVS14-30C>T；

(3) ヒトCD19遺伝子におけるc. *132(GT)₁₂₋₁₈；および

(4) ヒトFCGR2Bにおけるc. 695T>C。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の群より選択される少なくとも1の新規多型遺伝子：

- (1) ヒトCD19遺伝子におけるc. 705G>T；
- (2) ヒトCD19遺伝子におけるIVS14-30C>T；
- (3) ヒトCD19遺伝子におけるc. *132 (GT)₁₂₋₁₈；および(4) ヒトFCGR2Bにおけるc. 695T>C。

【請求項2】 以下を具備する対象における全身性エリテマトーデスの発症危険率を予測する方法；

- (1) 対象からのゲノムDNAサンプルを準備すること；
- (2) 得られたゲノムDNAサンプルについて以下の少なくとも1の多型の遺伝子型を決定すること；
- (a) ヒトCD19遺伝子におけるc. 705の遺伝子型；
- (b) ヒトCD19遺伝子におけるIVS14-30の遺伝子型；
- (c) ヒトCD19遺伝子におけるc. *132 (GT)の反復回数；
- (d) ヒトFCGR2Bにおけるc. 695の遺伝子型；並びに

(3) 前記(2)で選択された多型が前記(d)の多型であり、且つ該遺伝子型がコドン232T/Tを生じるような多型である場合には、更に(e) ヒト白血球HLA-DRB1*1501の有無を決定すること；

(4) 前記(2)および(3)において決定された遺伝子型を基にSLEの発症危険率を判定することにより対象における全身性エリテマトーデスの発症危険率を予測すること。

【請求項3】 コンピュータを利用した対象における全身性エリテマトーデスの発症危険率を予測する装置であって、以下を具備する装置；

- (1) ゲノムDNAを精製するための装置；
- (2) 前記(1)で精製されたゲノムDNAについて、以下からなる群より選択される少なくとも1の多型の遺伝子型を決定するための装置

(a) ヒトCD19遺伝子におけるc. 705の遺伝子型；

(b) ヒトCD19遺伝子におけるIVS14-30の遺伝子型；

(c) ヒトCD19遺伝子におけるc. *132 (GT)の反復回数；

(d) ヒトFCGR2Bにおけるc. 695の遺伝子型；および

(3) 上記(2)に記載の多型の遺伝子型に対して所定のスコアが対応させられているスコアテーブルを記憶する記憶手段；並びに

(4) (2)で決定された遺伝子型を基に前記(3)の

記憶手段に記憶される前記スコアテーブルを検索して、対応する得点データを抽出し、抽出された前記スコアデータの全て、および前記スコアの合計得点を出力する手段。

【請求項4】 コンピュータを利用した対象における全身性エリテマトーデスの発症危険率を予測する装置であって、以下を具備する装置；

(1) 以下からなる群より少なくとも1で選択された全身性エリテマトーデス感受性多型遺伝子；

(a) ヒトCD19遺伝子におけるc. 705G>T；

(b) ヒトCD19遺伝子におけるIVS14-30C>T；

(c) ヒトCD19遺伝子におけるc. *132 (GT)₁₂₋₁₈；および

(d) ヒトFCGR2Bにおけるc. 695T>Cの遺伝子型に対して所定のスコアが対応させられているスコアテーブルを記憶する記憶手段；並びに(2) 選択された多型について決定された遺伝子型を基に前記

(1)の記憶手段に記憶されたスコアテーブルを検索して、対応する得点データを抽出し、抽出された前記スコアデータの全て、および前記スコアの合計得点を出力する手段。

【請求項5】 コンピュータに、

(1) 得られたゲノムDNAサンプルについて以下の少なくとも1の多型の遺伝子型を決定すること；

(a) ヒトCD19遺伝子におけるc. 705の遺伝子型；

(b) ヒトCD19遺伝子におけるIVS14-30の遺伝子型；

(c) ヒトCD19遺伝子におけるc. *132 (GT)の反復回数；

(d) ヒトFCGR2Bにおけるc. 695の遺伝子型；並びに

(2) 前記(1)で選択された多型が前記(d)の多型であり、且つ該遺伝子型がコドン232T/Tを生じるような多型である場合には、更に(e) ヒト白血球HLA-DRB1*1501の有無を決定すること；

(3) 前記(1)および(2)において決定された遺伝子型を基にSLEの発症危険率を判定することにより対象における全身性エリテマトーデスの発症危険率を予測すること；を実行させるためのプログラム。

【請求項6】 コンピュータに

(1) ゲノムDNAを精製すること；

(2) 前記(1)で精製されたゲノムDNAについて、以下からなる群より選択される少なくとも1の多型の遺伝子型を決定すること；

(a) ヒトCD19遺伝子におけるc. 705の遺伝子型；

(b) ヒトCD19遺伝子におけるIVS14-30の遺伝子型；

(c) ヒトCD19遺伝子におけるc. * 132 (G T) の反復回数;

(d) ヒトFCGR2Bにおけるc. 695の遺伝子型; および

(4) (2) で決定された遺伝子型を基に、上記(2) に記載の多型の遺伝子型に対して所定のスコアが対応させられているスコアテーブルを記憶する記憶手段に記憶される該スコアテーブルを検索して、対応する得点データを抽出し、抽出された前記スコアデータの全て、および前記スコアの合計得点を出力すること;

(5) (4) で得られた合計得点から対象における全身性エリテマトーデスの発症危険率を予測すること; を実行させるためのプログラム。

【請求項7】 対象における全身性エリテマトーデスの発症危険率を予測する方法であって、以下を具備する方法。

(1) ゲノムDNAを精製すること;

(2) 前記(1) で精製されたゲノムDNAについて、以下からなる群より選択される少なくとも1の多型の遺伝子型を決定すること;

(a) ヒトCD19遺伝子におけるc. 705の遺伝子型;

(b) ヒトCD19遺伝子におけるIVS14-30の遺伝子型;

(c) ヒトCD19遺伝子におけるc. * 132 (G T) の反復回数; および

(d) ヒトFCGR2Bにおけるc. 695の遺伝子型;

(4) (2) で決定された遺伝子型を基に、上記(2) に記載の多型の遺伝子型に対して所定のスコアが対応させられているスコアテーブルを検索して、対応する得点データを抽出し、抽出された前記スコアデータの全て、および前記スコアの合計得点を出力すること; 並びに

(5) (4) で得られた合計得点から対象における全身性エリテマトーデスの発症危険率を予測すること。

【請求項8】 配列番号1から8に記載の塩基配列からなる群より選択された1の塩基配列により示されるポリヌクレオチド。

【請求項9】 請求項8に記載されたポリヌクレオチドにおいて、前記配列における多型遺伝子の存在する以外の部位において、1若しくは数個のヌクレオチドが欠失、置換または付加された修飾ポリヌクレオチド。

【請求項10】 配列番号1の2553位または8518位に存在する1ヌクレオチドを含む配列番号1に含まれる連続する10から30塩基の塩基配列によりポリヌクレオチドからなる断片。

【請求項11】 配列番号5の194位から223位までに存在する1ヌクレオチドを含む配列番号5に含まれる連続する15から30塩基の塩基配列によりポリヌクレオチドからなる断片。

【請求項12】 配列番号6は194位から229位までに存在する18ヌクレオチドを含む配列番号6に含まれる連続する18から30塩基の塩基配列によりポリヌクレオチドからなる断片。

【請求項13】 配列番号7の304位に存在する1ヌクレオチドを含む配列番号7に含まれる連続する15から30塩基の塩基配列によりポリヌクレオチドからなる断片。

【請求項14】 配列番号8の386位に存在する1ヌクレオチドを含む配列番号8に含まれる連続する15から30塩基の塩基配列によりポリヌクレオチドからなる断片。

【請求項15】 配列番号9に記載の塩基配列により示されるポリヌクレオチド。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、リウマチ性疾患の感受性遺伝子に関する。特に、日本人における全身性エリテマトーデス(以下、SLEと称す)の発症に関連する感受性遺伝子に関する。また、当該感受性遺伝子を用いてSLEの発症危険率を予測する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 慢性関節リウマチ(以下、RAと称す)や全身性エリテマトーデス(以下、SLEと称す)に代表されるリウマチ性疾患は、全身の主要臓器に難治性の慢性炎症をきたす自己免疫疾患である。

【0003】 RAは、全身の関節の破壊をきたす頻度の高い疾患である。その病態の特徴は、関節包を裏打ちし、関節腔を覆う数層の細胞からなる滑膜の異常増殖と慢性炎症、それに伴う骨および/または軟骨吸収である。また、全人口における有病率は0.5から1.0%である(文献1参照)。30から40歳代の女性に初発することが多く、罹患の男女比はおおよそ1:4である。第一度近親にリウマチの患者がいる場合には、その人が将来罹患する確率は、そうでない人に比べ4から8倍高いと言われる(文献2参照)。更に、双生児における発症の一致率は一卵性で12%、二卵性で4%(文献3-5参照)と差があることから、遺伝的要素の関与が強く示唆される。

【0004】 SLEは、RAに比べると頻度が低く、その有病率は0.01から0.10%程度である。10から30歳代の女性に初発することが多い疾患であり、男女比は1:9である。自己の細胞中の核や細胞質成分に対する自己抗体の出現を伴う全身性の免疫反応により、全身の各臓器や血球形が侵される。これまでに、SLEの患者同胞の罹患率が一般に比べ約20から400倍と高いことや、双生児研究によって一卵性双生児が二卵性のものに比べておよそ12倍リスクが高いことが報告されている(文献6参照)、SLEはRAよりも更に強い遺伝的な影響が疑われる。

【0005】以上のように、リウマチ性疾患の発症に何らかの遺伝要因が関与することには疑問の余地はないが、一卵性双生児における発症一致率が100%よりかなり低いことや、家族集積例におけるメンデル遺伝様式も見られないことから、リウマチ性疾患の発症には、複数の遺伝要因と環境要因、更には遺伝子再編成などの免疫学的な後天的要因の相互作用が関与することが示唆される。即ち、リウマチ性疾患は多因子疾患であると考えられる。しかしながら、その発症に関与する遺伝要因は未だに十分には解明されていない。

【0006】一方、CD19は、B細胞の分化、活性化および増殖を調節する分子である。CD19の欠損および過剰発現は、夫々、低ガンマグロブリン血症および自己抗体産生の原因となることがマウスにおいて証明されている。ヒトCD19遺伝子は、16p11.2の遺伝子座に位置し、慢性関節リウマチ（以下、RAと称す）とクローン病（以下、CDと称す）の候補遺伝子座の1つであると示唆されている。

【0007】CD19遺伝子は、Bリンパ球に特異的な95kDaの遺伝子であり、H鎖再編成時からプラズマ細胞分化までの早期のプレB細胞により発現される免疫グロブリン遺伝子スーパーファミリーに属する（文献7-9参照）。また、CD19分子は、B細胞表面のCD21、CD18およびLeu13と結合して、B細胞共受容体複合体を形成し、B細胞受容体(BCR)のシグナルを調節する。

【0008】現在、CD19分子のリガンドは同定されていないが、CD19のシグナルは、活性化された該補体成分の断片C3dのCD21に対する結合の結果として、CD19のシグナルが生じ得ると考えられる。これは、CD21が補体第3成分（以下、C3と記す）切断フラグメントの受容体であり、抗原-C3d複合体はCD21を介してB細胞に結合することに起因すると考えられる。

【0009】また、CD19は、CD40（文献10参照）、CD38（文献11参照）、CD72（文献10参照）、VLA4（文献12参照）およびFcγRIIB（文献13,14参照）を含む他の幾つかの細胞表面受容体のシグナル伝達のパートナーとして影響を与える。遺伝子ターゲティングマウスまたはトランスジェニックマウスにおいて細胞表面でのCD19の密度を変化させると、B細胞の機能に顕著な影響が生じることが示されている。CD19欠失(CD19^{-/-})マウスからのB細胞は、膜貫通シグナルに対して低反応性であり、分化、活性化の異常を示す（文献15-21参照）。これに対して、トランスジェニックマウスにおけるCD19の過剰発現は、膜貫通シグナルに対して過反応性であり、且つ体液性の免疫反応の上昇したB細胞を生じる。また、そのようなマウスは、おそらく骨髄における高い負の選択により生じると考えられる末梢プールにおけるB細胞数の減少を示す。加えて、

抗二本鎖(ds)DNA抗体およびリウマトイド因子を含む自己抗体の産生も観察される（文献15,17-20,22,23参照）。このように、CD19は、末梢のB細胞プールの増殖のための重要なシグナル閾値を調節するための、いわば分子として機能するようである（文献24参照）。

【0010】CD19の240アミノ酸の細胞質領域は、9つの保存されたチロシン残基を含み（文献8参照）、BCRおよび/またはCD19のライゲーションに続くそのリン酸化は、当該細胞表面に対して調節分子を供給するSrcホモロジー(SH2)認識モチーフを提供する。Lyn、FynおよびLckタンパクチロシンキナーゼ(PTKs)、並びにプロトオンコジーンVavは、CD19と相互作用する。また、CD19は、ホスファチジルイノシトール3-キナーゼ(PI3-キナーゼ)とも相互作用する（文献25参照）。PI3-キナーゼは、シグナル下流の多くのエフェクター分子の膜局在化および活性化を調節する。

【0011】現在、自己免疫疾患の発症は多くの遺伝的要因を含むという仮説に従って、ゲノムワイドなスクリーニングから示唆された感受性候補遺伝子座が多くの染色体領域においてマッピングされている。特に、RAまたはクローン病の候補領域は16p11.2を含み、そこにはCD19をコードする遺伝子も含まれる（文献26,27参照）。加えて、SLE患者におけるB細胞は、活性化されていると考えられる（文献28参照）。興味深いことに、B細胞におけるCD19発現のレベルは、抗核抗体に関連する全身性自己免疫疾患の1つである、全身硬化を伴う患者において約20%高いことが示されている（文献29参照）。

【0012】一方、ゲノムワイドな連鎖解析により、染色体領域1q23がヒトSLEの候補領域（文献30,31参照）、およびマウスループスエリテマトーデスにおけるそのシンテニー領域（文献32参照）であることが示唆された。3つのFcγRII遺伝子（即ち、FCGR2A,2Bおよび2C）と2つのFcγRIII遺伝子（即ち、FCGR3Aおよび3B）は1q23における約200kbの領域にマッピングされており（文献33-36参照）、SLEの感受性遺伝子候補と見なされている。種々の集団におけるFcγRs多型とSLEとの関連性は、広範に研究されており、FcγRIIA-131H/R、FcγRIIIA-176F/VおよびFcγRIIIA-NA1/2多型が一部の人類集団でSLEと関連していることが示された（文献38,40参照）。しかしながら、その結果は、異なる遺伝子背景を有する集団においては矛盾するものであり、この染色体領域における他の遺伝子がSLEと主に関連する可能性を示唆している。

【0013】FcγR2Bは、FcγRファミリーの中で唯一、免疫レセプターチロシン基抑制性モチーフ(ITIMとも記す)をコードする遺伝子であり、B細胞および骨髄単球細胞における抑制性シグナルを伝達する能力を

10

20

30

40

50

有している(文献39参照)。マウスにおけるFcγRIIBの欠失は、コラーゲン誘導関節炎およびグットバスター症候群等の自己免疫疾患と関連性があることが最近になって示されている(文献41, 42参照)。更にその上、抗核抗体と糸球体腎炎の自然発生的な進展が、C57BL/6マウスの背景にFcγRIIB欠失を導入した場合に報告されている(文献43参照)。(NZB × NZW) F1マウス(文献44参照)および他の自己免疫傾向マウス(文献45参照)の脾臓胚中心のB細胞におけるFcγRIIB発現レベルの低下と関連し、IgG抗体産生の異常な亢進を誘導することが報告された。加えて、互いに連鎖不平衡にある翻訳領域内の4つのSNPsがlupus-proneマウス系ではFcγRIIBの感受性の対立遺伝子を形成することも示された。これらの発見は、FCGR2Bが、染色体領域1q23におけるヒトSLEに対する主な感受性遺伝子であり得ることを提起するものである。

【0014】これまでのところ、以上のようなSLEおよび免疫機能に関連する種々の分子に関する部分的な知見が報告されるのみであって、SLEに感受性のある遺伝子的な要因に関する具体的な報告はなされていない。

【0015】

【発明の解決しようとする課題】このような状況に鑑み、本発明は、全身性エリテマトーデスの感受性遺伝子を提供することと、当該感受性遺伝子を用いて全身性エリテマトーデスの発症危険率を予測する方法を提供することである。

【0016】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、代表的リウマチ性疾患、特に、全身性エリテマトーデス(SLE)の病因および病態を解明するために、病態上の重要性、正常組織と病変組織のmRNA発現プロファイリング、連鎖解析の成果、動物モデルからの情報などに基づいて、設定した多数の候補遺伝子の変異解析を系統的に行い、疾患との関連性を解析した。このような鋭意研究の結果、以下のような解決手段を見出した。

【0017】即ち、本願発明は、

1. 以下の群より選択される少なくとも1の新規多型遺伝子；

(1) ヒトCD19遺伝子におけるc. 705G>T；

(2) ヒトCD19遺伝子におけるIVS14-30C>T；

(3) ヒトCD19遺伝子におけるc. *132(GT)₁₂₋₁₈；および

(4) ヒトFCGR2Bにおけるc. 695T>C。

【0018】2. 以下を具備する対象における全身性エリテマトーデスの発症危険率を予測する方法；

(1) 対象からのゲノムDNAサンプルを準備すること；

(2) 得られたゲノムDNAサンプルについて以下の少なくとも1の多型の遺伝子型を決定すること；

(a) ヒトCD19遺伝子におけるc. 705の遺伝子型；

(b) ヒトCD19遺伝子におけるIVS14-30の遺伝子型；

(c) ヒトCD19遺伝子におけるc. *132(GT)の反復回数；

(d) ヒトFCGR2Bにおけるc. 695の遺伝子型；並びに

(3) 前記(2)で選択された多型が前記(d)の多型であり、且つ該遺伝子型がコドン232T/Tを生じるような多型である場合には、更に(e) ヒト白血球HLA-DRB1*1501の有無を決定すること；

(4) 前記(2)および(3)において決定された遺伝子型を基にSLEの発症危険率を判定することにより対象における全身性エリテマトーデスの発症危険率を予測すること。

【0019】3. コンピュータを利用した対象における全身性エリテマトーデスの発症危険率を予測する装置であって、以下を具備する装置；

(1) ゲノムDNAを精製するための装置；

(2) 前記(1)で精製されたゲノムDNAについて、以下からなる群より選択される少なくとも1の多型の遺伝子型を決定するための装置

(a) ヒトCD19遺伝子におけるc. 705の遺伝子型；

(b) ヒトCD19遺伝子におけるIVS14-30の遺伝子型；

(c) ヒトCD19遺伝子におけるc. *132(GT)の反復回数；

(d) ヒトFCGR2Bにおけるc. 695の遺伝子型；および

(3) 上記(2)に記載の多型の遺伝子型に対して所定のスコアが対応させられているスコアテーブルを記憶する記憶手段；並びに

(4) (2)で決定された遺伝子型を基に前記(3)の記憶手段に記憶される前記スコアテーブルを検索して、対応する得点データを抽出し、抽出された前記スコアデータの全て、および前記スコアの合計得点を出力する手段。

【0020】4. コンピュータを利用した対象における全身性エリテマトーデスの発症危険率を予測する装置であって、以下を具備する装置；

(1) 以下からなる群より少なくとも1で選択された全身性エリテマトーデス感受性多型遺伝子；

(a) ヒトCD19遺伝子におけるc. 705G>T；

(b) ヒトCD19遺伝子におけるIVS14-30C>T；

(c) ヒトCD19遺伝子におけるc. *132(GT)

T)₁₂₋₁₈ ;および

(d) ヒトFCGR2Bにおけるc. 695T>Cの遺伝子型に対して所定のスコアが対応させられているスコアテーブルを記憶する記憶手段;並びに

(2) 選択された多型について決定された遺伝子型を基に前記(1)の記憶手段に記憶されたスコアテーブルを検索して、対応する得点データを抽出し、抽出された前記スコアデータの全て、および前記スコアの合計得点を出力する手段。

【0021】5. コンピュータに、

(1) 得られたゲノムDNAサンプルについて以下の少なくとも1の多型の遺伝子型を決定すること;

(a) ヒトCD19遺伝子におけるc. 705の遺伝子型;

(b) ヒトCD19遺伝子におけるIVS14-30の遺伝子型;

(c) ヒトCD19遺伝子におけるc. *132(GT)の反復回数;

(d) ヒトFCGR2Bにおけるc. 695の遺伝子型;並びに

(2) 前記(1)で選択された多型が前記(d)の多型であり、且つ該遺伝子型がコドン232T/Tを生じるような多型である場合には、更に(e) ヒト白血球HLA-DRB1*1501の有無を決定すること;

(3) 前記(1)および(2)において決定された遺伝子型を基にSLEの発症危険率を判定することにより対象における全身性エリテマトーデスの発症危険率を予測すること;を実行させるためのプログラム。

【0022】6. コンピュータに

(1) ゲノムDNAを精製すること;

(2) 前記(1)で精製されたゲノムDNAについて、以下からなる群より選択される少なくとも1の多型の遺伝子型を決定すること;

(a) ヒトCD19遺伝子におけるc. 705の遺伝子型;

(b) ヒトCD19遺伝子におけるIVS14-30の遺伝子型;

(c) ヒトCD19遺伝子におけるc. *132(GT)の反復回数;

(d) ヒトFCGR2Bにおけるc. 695の遺伝子型;および

(4) (2)で決定された遺伝子型を基に、上記(2)に記載の多型の遺伝子型に対して所定のスコアが対応させられているスコアテーブルを記憶する記憶手段に記憶される該スコアテーブルを検索して、対応する得点データを抽出し、抽出された前記スコアデータの全て、および前記スコアの合計得点を出力すること;

(5) (4)で得られた合計得点から対象における全身性エリテマトーデスの発症危険率を予測すること;を実行させるためのプログラム。

【0023】7. 対象における全身性エリテマトーデスの発症危険率を予測する方法であって、以下を具備する方法。

【0024】(1) ゲノムDNAを精製すること;

(2) 前記(1)で精製されたゲノムDNAについて、以下からなる群より選択される少なくとも1の多型の遺伝子型を決定すること;

(a) ヒトCD19遺伝子におけるc. 705の遺伝子型;

(b) ヒトCD19遺伝子におけるIVS14-30の遺伝子型;

(c) ヒトCD19遺伝子におけるc. *132(GT)の反復回数;および

(d) ヒトFCGR2Bにおけるc. 695の遺伝子型;

(4) (2)で決定された遺伝子型を基に、上記(2)に記載の多型の遺伝子型に対して所定のスコアが対応させられているスコアテーブルを検索して、対応する得点データを抽出し、抽出された前記スコアデータの全て、および前記スコアの合計得点を出力すること;並びに

(5) (4)で得られた合計得点から対象における全身性エリテマトーデスの発症危険率を予測することである。

【0025】

【発明の実施の形態】本発明は、本発明者らが、B細胞においてB細胞の活性化を制御する分子であるCD19とFcγR2B受容体がSLE発症に関連する可能性があるというこれまでの知見を基に、CD19およびFcγR2B受容体の遺伝子における変異を検出し、検出された変異とSLE発症との関連を解析し、それによりSLE感受性遺伝子を初めて同定したことによって達成された。

【0026】1. 用語の説明

ここで使用される「感受性遺伝子」(susceptibility gene)とは、SLEの発症危険率を左右する発症関連遺伝子をいう。ここで使用される「SLEの発症危険率」とは、SLEの発症の危険性の相対的な度合いを示す。

【0027】ここにおいて「多型遺伝子」とは、1つの遺伝子座を占める複数種の対立遺伝子群、又はこのような対立遺伝子群に属する個々の対立遺伝子を指称するものとする。また、多型部位の中で1塩基のみが異なるものは、特に「単塩基多型」(Single Nucleotide Polymorphism、以後、SNPと称する)と指称する。また、ここで使用する「遺伝子型」の語は、注目している遺伝子座の対立遺伝子の存在状態を示す。

【0028】ここで使用される「ポリヌクレオチド」の語は、便宜的にポリヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチド等を総括した意味で用いる。ここで「オリゴヌクレオチド」とは、数個から数十個のヌクレオシドのリン酸エステル(即ち、ヌクレオチド)がホスホジエステル結合

で重合した物質を意味し、オリゴリボヌクレオチドとオリゴデオキシリボヌクレオチドとが含まれるが、これに限定されるものではない。また、ここで「ポリヌクレオチド」とは、2以上のヌクレオシドがリン酸エステル結合によって結合されてなる物質を意味する。ヌクレオシドには、デオキシリボヌクレオシドおよびリボヌクレオシドが含まれるが、これに限定されない。更に、本発明において「ポリヌクレオチド」とは、ペプチド核酸、モルホリノ核酸、メチルフォスフォネート核酸、S-オリゴ核酸などの人工合成核酸も指称するものとする。

【0029】2. 多型とSLE発症との関連

(1) CD19遺伝子

CD19遺伝子における多型のスクリーニングは、1本鎖DNA高次構造多型PCR (PCR-single strand conformation polymorphism; 以下PCR-SSCP法と略す) と直接シーケンス法を用いて行った。更に、検出された多型の疾患に対する関連性を、日本人集団におけるケースコントロール関連解析法 (case-control association analysis) によって解析した。

【0030】その結果、本発明者らはCD19遺伝子における6つの新規多型を同定し、更に、同定された多型のうちの3つの多型にSLE発症との関連性が存在することを明らかにした。以下、発明者により新たに同定され、且つSLE発症との関連が明かとなった3つの多型、即ち、c. 705G>T (P235P)、IVS14-30C>T、およびc. *132 (GT)₁₂₋₁₈ について説明する。

【0031】ここで使用される「c. 705G>T」の語は、CD19遺伝子の翻訳領域の705位に存在するSNPにおいて存在し得る遺伝子型、即ち、チミン (Tと略す) およびグアニン (Gと略す) のうちの遺伝子型Tの遺伝子型を示す。また、これらの遺伝子型のうち、従来から一般的に知られている配列における当該位置の塩基はGである。c. 705の遺伝子型がTである場合に、ホモ接合体であってもヘテロ接合体であっても、SLEを発症する危険性が低い (即ち、低危険率遺伝子型である)。また、本多型においては、Gの場合であってもTの場合であっても、相当するコドンの235位のアミノ酸はプロリン (Pと略す) であり、同義置換である。ここで使用される「c. 705T」は該遺伝子の対立遺伝子c. 705が遺伝子型Tであることを示す。

【0032】ここで使用される「IVS14-30C>T」の語は、CD19遺伝子の転写開始部位から数えて14番目のイントロン領域の30位に存在するSNPにおいて存在しうる遺伝子型、即ち、シトシン (Cと略す) とチミン (Tと略す) のうちの遺伝子型Tの遺伝子型を示す。また、これらの遺伝子型のうち、従来から一般的に知られている配列における当該位置の塩基はCであ

る。IVS14-30の遺伝子型がTである場合に、ホモ接合体であってもヘテロ接合体であっても、SLEを発症する危険率が低い。ここで使用される「IVS14-30T」は該遺伝子の対立遺伝子IVS14-30が遺伝子型Tであることを示す。

【0033】また、対立遺伝子c. 705およびIVS14-30は、連鎖不平衡で結ばれるハプロタイプの関係にある。従って、どちらか一方が存在すれば残る他方も存在する可能性は非常に高い。従って、何れかを検出することにより、患者におけるSLE発症の危険率を予測することが可能である。

【0034】ここで使用される「c. *132 (GT)₁₂₋₁₈」の語は、CD19の非翻訳領域 (即ち、3' UTR) の132位に対応するゲノムDNAにおける12回から18回のGT反復の多型を示す。この反復回数が15回以上に伸長されている個体の場合、SLE発症の危険率は高い。このような関連は、RAおよびクローン病においては観察されなかった。「c. *132 (GT)₁₅₋」は該遺伝子座のマイクロサテライト多型の反復回数が15以上である遺伝子型を示す。

【0035】これらの多型は平成12年12月19日にGenBank/EMBL/DDBJに登録番号AB05799、AB052814、AB052815、AB052816、AB052817およびAB052818として発明者らにより登録された。

【0036】(2) Fcγ受容体IIB (FCGR2B遺伝子)

ヒト低親和性Fcγ受容体遺伝子群は、FcγRIIA、IIB、IIC、IIIAおよびIIIBからなる遺伝子ファミリーを構成し、染色体1q23領域に位置する。それらは、リガンド親和性、細胞の分布およびエフェクター機能 (文献37, 38参照) において互いに異なる。特に、FcγRIIBは、その細胞質ドメインにおける免疫レセプターチロシン基抑制性モチーフ (ITIM) を介しての抑制性シグナルを伝達する能力においてユニークである。

【0037】今回、発明者らは、ヒトFCGR2B遺伝子における新規のSNP、即ち、c. 695T>Cを同定し、その多型の遺伝子型とSLEとの関連性を明らかにした。c. 695T>Cはエクソン5に位置する多型である。

【0038】ここで使用される「c. 695T>C」の語は、ヒトFCGR2B遺伝子の翻訳領域の695位に存在するSNPにおいて存在し得る遺伝子型、即ち、TおよびCのうちの遺伝子型Cの遺伝子型を示す。また、これらの遺伝子型のうち、従来から一般的に知られている配列における当該位置の塩基はTであることを示す。ここで使用される「c. 695C」は該遺伝子の対立遺伝子c. 695が遺伝子型Cであることを示す。

【0039】また、この多型は、Fcγ受容体IIBの

10

20

30

40

50

膜貫通ドメインにおけるコドン232の位置に2つの対立遺伝子を与える。即ち、遺伝子型がCの場合には、コドン232はトレオニン (Thr または T と略す)、即ち、232T、がコードされる。一方、遺伝子型がTの場合には、コドン232はイソロイシン (Ile または I と略す)、即ち、232I、がコードされる。

【0040】SLE患者における232T/T遺伝子型を有する個体は、健常者と比較して顕著に多い。即ち、2つの対立遺伝子の該多型の遺伝子型が共にCのホモ接合体である場合にSLEの発症危険率が高い。

【0041】また、強い連鎖不平衡が、FcγRIIB-232I/TとFcγRIIB-NA1/2多型の間において検出されたが、その関連性の強さの比較により、SLEとの関連においては、上記のFCGR2Bの多型が第一義の感受性遺伝子であると考えられた。また更に、相乗作用効果がFCGR2B 232T/T遺伝子型と、HLA-DRB1*1501との間に存在するようである。自己免疫の調節におけるFcγRIIBの役割を証明する最近の動物実験の結果を考え合わせると、本研究は、ヒトSLEに対する遺伝子感受性におけるFcγRIIBの役割を強力に示唆するものである。

【0042】本発明者らが決定したFCGR2B遺伝子における多型は、登録番号AB050934およびAB051387で平成12年11月8日および同年11月20日にGenBankに発明者らによって登録された。また、ここで使用した公知のFCGR2B遺伝子配列は、AH005422およびNM004001、FCGR2AはAH003095、FCGR2CはAH002832である。

【0043】3. 多型

本発明の1つの側面に従うと、以下の群より選択される新規多型遺伝子：

- (1) ヒトCD19遺伝子におけるc. 705G>T；
 - (2) ヒトCD19遺伝子におけるIVS14-30C>T；
 - (3) ヒトCD19遺伝子におけるc. *132 (GT)₁₂₋₁₈ ；および
 - (4) ヒトFCGR2Bにおけるc. 695T>C；
- が提供される。

【0044】上述の通り、これらはSLEに感受性のあるまたは低危険率の多型、特に、日本人におけるSLEに感受性または抵抗性のある多型である。従って、これらの遺伝子型の少なくとも1を決定すれば、対象における相対的なSLE発症危険率を予想することが可能である。

【0045】4. 予測方法

本発明の1つの側面に従うと、SLEの発症危険率を予測する方法が提供される。即ち、以下を具備するSLEの発症危険率を予測する方法；

- (1) 対象からゲノムDNAサンプルを準備すること；

(2) 得られたゲノムDNAサンプルについて以下の少なくとも1の遺伝子型を決定すること；

- (a) ヒトCD19遺伝子におけるc. 705の遺伝子型；
- (b) ヒトCD19遺伝子におけるIVS14-30の遺伝子型；
- (c) ヒトCD19遺伝子におけるc. *132 (GT)の反復回数；および
- (d) ヒトFCGR2Bにおけるc. 695の遺伝子型；並びに

(3) 決定された遺伝子型を基にSLEの発症危険率を判定することにより対象における全身性エリテマトーデスの発症危険率を予測すること；が提供される。

【0046】本方法の適用が好ましい個体は、ヒトであり、特に、日本人が好ましい。

【0047】対象からゲノムDNAサンプルを準備する手段は、対象から得た末梢血中の白血球、単球、リンパ球および顆粒球等の血球細胞からフェノールクロホルム法、塩析法または市販のキット等を用いて抽出する方法等、一般的に使用される何れの手段を用いてもよい。

【0048】遺伝子型を決定する手段は、直接シーケンシング法、SSCP法、オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション法および特異的プライマー法等の一般的に使用される何れの手段を用いてもよい。

【0049】遺伝子型とSLE発症危険率の判定は以下の通りである。予測対象において、上記(1)の多型の遺伝子型がTであることを第1の個体において検出した場合、当該多型の遺伝子型がGである第2の個体と比較してSLE発症危険率は低い。上記(2)の多型の遺伝子型がTである場合、SLE発症危険率は低い。また、上述した通り(1)と(2)の多型は互いにハプロタイプを形成する。従って、何れか一方を検出しても、両方の遺伝子型を決定して判断してもよい。

【0050】予測対象において、上記(3)の多型においてGTの反復回数が15回以上である場合には、それ以下の回数の対象と比較してSLE発症の危険率が高い。

【0051】また、予測対象において、その2つの対立遺伝子における上記(4)の多型の遺伝子型が2つともにCである場合、即ち、前記対象の2つの対立遺伝子が232T/Tのホモ接合体である場合には、そうでない場合、即ち、該対立遺伝子が232I/Tのヘテロ接合体または232I/Iのホモ接合体である場合、に比較してSLE発症の危険率は高い。更にまた、予測対象の対立遺伝子が232T/Tのホモ接合体であり、それに加えて遺伝子座HLA-DRB1*1501も存在する場合には、232T/T遺伝子型が単独で存在する場合に比べてSLE発症の危険率は更に高い。

【0052】ここで、「HLA-DRB1*1501」は、ヒト白血球抗原 (HLA と略す) 遺伝子のクラスI

Iに含まれるDRB1遺伝子座の対立遺伝子を示す。

【0053】SLEの発症危険率の予測には、上記の(1)から(4)までの多型の遺伝子型を全て決定して行っても、何れか1のみを行っても、これらを組み合わせて大なってもよい。例えば、ハプロタイプである上記(1)および(2)のうちの何れか1の多型と、上記(3)および(4)の多型の3の多型の遺伝子型を決定して行ってもよい。或いは、上記(1)から(4)の何れかを任意に組み合わせて決定することにより行ってもよい。更に、(4)の遺伝子型に応じてHLAの多型を決定し、これを更に考慮して予測を行ってもよい。

【0054】5. SLEの発症危険率を予測する装置本発明の1つの側面に従うと、SLEの発症危険率を予測する装置が提供される。即ち、コンピュータを利用したSLEの発症危険率を予測する装置であって、以下を具備する装置；

(1) ゲノムDNAを精製するための装置；
(2) 上記(1)で得られたゲノムDNAについて、以下からなる群より選択された多型の遺伝子型を決定するための装置

(1) ヒトCD19遺伝子におけるc. 705の遺伝子型；

(2) ヒトCD19遺伝子におけるIVS14-30の遺伝子型；

(3) ヒトCD19遺伝子におけるc. * 132 (GT)の反復回数；

(4) ヒトFCGR2Bにおけるc. 695の遺伝子型；および

(5) ヒト白血球HLA-DRB1* 1501の有無；

(3) 上記(2)に記載の多型の遺伝子型に対して所定のスコアが対応させられているスコアテーブルを記憶する記憶手段；並びに

(4) (2)で決定された遺伝子型を基に前記スコアテーブルを検索して、対応する得点データを抽出し、抽出された前記スコアデータの全て、および前記スコアの合計得点を出力する手段；が提供される。

【0055】図1は、本発明のSLE発症危険率予測装置の1態様の構成図である。全ての構成要素はバス線11を介したバス接続により接続されている。図1に示す通り、対象からの試料からゲノムDNAサンプルを精製するための手段1と、手段1により得られた核酸から所望の多型における遺伝子型を決定するための手段2、表示装置3、およびキーボードやマウス等の入力手段4が、バス線11に接続されている。

【0056】CPU5は、精製プログラム12を実行して、ゲノムDNAサンプル精製装置1を制御して、試料からのゲノムDNAの精製を行う。精製されたゲノムDNAは精製装置1に接続された遺伝子型決定装置2に輸送され、そこにおいて遺伝子型決定がなされる。この遺伝子型決定は、CPU5が、遺伝子型決定プログラム1

3を実行し、遺伝子型決定装置2を制御することにより達成される。

【0057】遺伝子型決定装置2の遺伝子型に関する情報は、コンピュータによって扱うことが可能な情報形態に変換される。例えば、そのような情報は、一般的に、蛍光強度、放射能レベルおよび吸光度等により得られるので、そのような光信号等の情報を一般的な手段により電気信号に変換すればよい。また、この工程は、手動により行った電気泳動の結果またはハイブリダイゼーションの結果をオペレーターが見て、その結果から陽性または陰性を判断することによって行ってもよい。

【0058】得られた遺伝子型に関する情報を基に、CPU5は、予測プログラムを実行して、表示すべき画像データの指示、遺伝子型およびその組合せからスコアの検索等を行う。RAM6は、表示用の画像データを一旦格納するものであり、画像処理部7は、CPU5からの指示に従って必要な画像データを生成して表示装置3に画像を表示する。

【0059】本SLE発症危険率予測装置内のメモリには、大きくわけて3つのファイルが格納される。

【0060】第1のファイル8内には、精製プログラム12、遺伝子型決定プログラム13および精製および遺伝子型決定に関連する画像データが記憶されている。第2のファイル9内には、予測プログラム15と予測に関連する画像データが記憶されている。更に第3のファイル10内にはスコアテーブルが記憶されている。

【0061】図2(a)は、スコアテーブルの例を示す。図2(b)は、表示画面の例の一部分を示す図である。本表示は、図2(a)のスコアテーブルの右側に、遺伝子型決定装置2により得たデータと、該スコアテーブルを検索して読み出したスコアと、これを集計したスコア合計「3」が表示されている。

【0062】図3のフローチャートに従って、本SLE発症危険率予測装置による動作を説明する。(S1)予測開始の指示が出されると、精製プログラムに従って精製が実行される。(S2)該精製が完了すると、遺伝子型決定プログラムに従ってNo. 1からNo. 4までの多型について遺伝子型の決定が実行される。(S3)No. 4の多型がコドン232T/Tを与えるような遺伝子であった場合、(S4)に進み、そうでない場合には(S5)に進む。(S4)No. 5の遺伝子型の検出が行われる。(S5)スコアテーブルを検索して、決定された遺伝子型に対応するスコアを読み出し、合計のスコアを集計する。(S6)決定された遺伝子型、取得スコアおよびスコアの合計を表示装置3に表示する。

【0063】対象からの試料は、血球を含む血液およびリンパ液等の液体試料であっても、何れの組織試料であってもよく、或いは、予めそれらの試料から予め所望の程度にまでゲノムDNAを精製したものであってもよい。

【0064】前記試料からゲノムDNAサンプルを精製するための装置は、DNA自動抽出装置（例えば、ABIまたは東洋紡等により入手可能である）の一般的に使用される何れの装置を用いてもよい。当然ながら、この工程は、抽出キット等を使用する、それ自身公知の一般的な手段によりオペレーターが手動で行ってもよい。

【0065】遺伝子型を決定するための装置は、自動シーケンサーおよびFRET法を用いるリアルタイムPCR装置（例えば、ABI7700、LghyCycllex等）等の一般的に使用される何れの装置を用いてもよい。また当然ながら、この工程も、抽出キット等を使用する、それ自身公知の一般的な手段によりオペレーターが手動で行ってもよい。

【0066】また、ここでは、ゲノムDNAサンプルの精製と遺伝子型決定を、夫々、ゲノムDNAサンプル精製装置1および遺伝子型決定装置2により自動で行う装置の例を示したが、ゲノムDNAサンプル精製装置1および遺伝子型決定装置2は、両方共にまたはどちらか一方のみが具備されていない装置も本発明の範囲内に含まれる。以下に、該装置が両方共に具備されない例を示す。

【0067】本発明の1つの側面に従うと、SLE感受性の新規多型の遺伝子型からSLEの発症危険率を予測する装置が提供される。即ち、コンピュータを利用したSLEの発症危険率を予測する装置であって、以下を具備する装置；

(1) SLE感受性多型の遺伝子型の組合せに対して所定のスコアが対応させられているスコアテーブルを記憶する記憶手段；並びに(2) 選択された多型について決定された遺伝子型を基に前記スコアテーブルを検索して、対応する得点データを抽出し、抽出された前記スコアデータの全て、および前記スコアの合計得点を出力する手段；が提供される。本態様の構成を図4に示す。SLE感受性多型における遺伝子型を手動により決定し、そのデータを入力手段から入力し、そのデータを基に、SLE発症危険率予測を行う。

【0068】詳述した装置は、本発明の新規多型、即ち、(1) ヒトCD19遺伝子におけるc. 705G>T、(2) ヒトCD19遺伝子におけるIVS14-30C>T、(3) ヒトCD19遺伝子におけるc. *132(GT)₁₂₋₁₈、(4) ヒトFCGR2Bにおけるc. 695T>Cの他に、他の疾患関連遺伝子および/または多型、並びに血液型に関する多型等の他の解析を同時に行うようにプログラムしてもよい。

【0069】このような装置により、SLE発症危険率の予測が簡便に行うことが可能である。

【0070】また、本発明の1つの側面に従うと、以下のポリヌクレオチドが提供される。即ち、

(a) 配列番号1から8に記載の塩基配列からなる群より選択された1の塩基配列により示されるポリヌクレ

オチド；

(b) 上記(a)に記載されたポリヌクレオチドにおいて、前記配列における多型遺伝子の存在する以外の部位において、1若しくは数個のヌクレオチドが欠失、置換または付加された修飾ポリヌクレオチド；

(c) 配列番号1の2553位または8518位に存在する1ヌクレオチドを含む配列番号1に含まれる連続する10から30塩基の塩基配列によりポリヌクレオチドからなる断片；

10 (d) 配列番号5の194位から223位までに存在する15ヌクレオチドを含む配列番号5に含まれる連続する15から30塩基の塩基配列によりポリヌクレオチドからなる断片；

(e) 配列番号6は194位から229位までに存在する18ヌクレオチドを含む配列番号6に含まれる連続する18から30塩基の塩基配列によりポリヌクレオチドからなる断片；

20 (f) 配列番号7の304位に存在する1ヌクレオチドを含む配列番号7に含まれる連続する15から30塩基の塩基配列によりポリヌクレオチドからなる断片；

(g) 配列番号8の386位に存在する1ヌクレオチドを含む配列番号8に含まれる連続する15から30塩基の塩基配列によりポリヌクレオチドからなる断片；および

(h) 配列番号9に記載の塩基配列により示されるポリヌクレオチド；である。

【0071】配列番号1に示される前記ポリヌクレオチドはc. 705およびIVS14-30を含むヒトCD19遺伝子の一部である。この塩基配列のうち、SLEの発症に関与しているのは当該配列のSNP部位、即ち、2553位および8518位である。従って、本発明のポリヌクレオチドが配列番号1の断片である場合には、当該部位に存在する少なくとも1個のヌクレオチドを含むSNP部位を含む配列番号1の断片がより好ましい。

【0072】配列番号2から6に示される前記ポリヌクレオチドは、c. *132(GT)の反復回数を含むヒトCD19遺伝子である。特に、配列番号5および6は、反復回数が15以上であり、SLE発症の危険率を求める上で有用性が高い。

【0073】配列番号7は、c. 695を含むヒトFCGR2B遺伝子である。この塩基配列のうち、SLEの発症に関与しているのは当該配列のSNP部位、即ち、221位および304位である。従って、本発明のポリヌクレオチドが配列番号7の断片である場合には、当該部位に存在する少なくとも1個のヌクレオチドを含むSNP部位を含む断片であることが好ましい。

【0074】配列番号8も配列番号7と同様に、c. 695を含むヒトFCGR2B遺伝子である。この塩基配列のうち、SLEの発症に関与しているのは当該配列の

SNP部位、即ち、386位である。従って、本発明のポリヌクレオチドが配列番号8の断片である場合には、当該部位に存在する1個のヌクレオチドを含むSNP部位を含む断片であることが好ましい。

【0075】これらのポリヌクレオチドは、例えば、対象の遺伝子型を決定するための各種PCR増幅のためのプライマーとして、またはDNAチップにおいて使用するプローブとして使用してよい。この場合、本ポリヌクレオチドは、10ヌクレオチド以上30ヌクレオチド以下であることが望ましい。ポリヌクレオチド断片の長さが過度に長いと、1個のヌクレオチドの相違を識別することが困難になる。また、基本的にポリヌクレオチドの長さが過度に短いと試料中に含まれるポリヌクレオチドの塩基配列の決定が困難になる。

【0076】特に、配列番号9に示すポリヌクレオチドは、FCGR2Bに特異的なプライマーとして有用な配列である。特に、このポリヌクレオチドは、PCRの下流用のプライマーとして使用するのに有用である。

【0077】

【実施例】例1. 日本における全身性エリテマトーデスへの感受性とCD19多型の関連性

例1では、CD19の多型配列をスクリーニングして多型を検出し、検出された多型とSLEとの関連を調べた。

【0078】1. 材料および方法

(1) 患者および健常者

先ず初めに、RA患者127例、SLE患者(第1のSLE群: 以下、SLE1群と称す)87例、クローン病患者156例、および健常者247例について、ケースコントロール関連分析(case-control association study)を行った。更に、SLE1群において検出された関連性を追試するために、99例のSLE患者からなる独立した第2のSLE群(以下、SLE2群と称す)を構成した。従って、SLE患者の総症例数は186例である。

【0079】対照群である健常者は、東京大学および日本赤十字中央血液センターの研究者、研究室職員および学生から構成される男性145例と女性102例(平均年齢: 36.6歳)である。RA患者、男性18例と女性168例(平均年齢: 57.8歳)を、米国リウマチ学

会の分類基準に従って分類した(文献46参照)。SLE1およびSLE2は、それぞれ、男性12例と女性75例(平均年齢: 40.3歳)、男性6例と女性93例(平均年齢: 40.0歳)から構成された。SLE患者は、米国リウマチ学会の分類基準に従って分類した(文献47参照)。クローン患者、男性124例と女性32例(平均31.1歳)は、臨床学的に、X線撮影、内視鏡の検査および生検標本の組織学的試験により診断された。CVID患者は、男性3例と女性1例であった。CVID患者からの末梢血単核細胞中のCD19陽性B細胞の割合は、それぞれ10%、3.3%、3.0%および0%であった。

【0080】ケースコントロールスタディに使用された全健常者および患者は、互いに血縁関係にない関東在住の日本人である。日本の中心部は、遺伝的背景に関して比較的均質であることは既に示されているため(文献48参照)、本研究で使用されるケースコントロールスタディによる試験が可能となる。

【0081】当該患者の臨床学的特徴は、各患者の診察記録から得た。そこから十分な情報が得られない場合には、その患者は詳細な分析対象から除外した。ここでの腎炎は、持続性蛋白尿が0.5g/day若しくは3+以上であるか、細胞円柱の所見のあるものをいい、中枢神経系疾患は、痙攣または精神病をいうが、これらはACR診断基準(文献47参照)に従って定義した。

【0082】なお、本研究は、東京大学、順天堂大学およびUCLAのヒト対象保護委員会の研究倫理審査委員会によって承認された。

【0083】(2) ゲノムDNA

ゲノムDNAは、患者および健常者の末梢血白血球から、QIAamp・ブラッド・キット(QIAamp Blood kit, Qiagen, Hilden, Germany)を使用して精製した。

【0084】(3) PCR一本鎖構造多型(PCR-single strand conformation polymorphism; 以下、PCR-SSCPと称す)

PCRに使用したプライマーとアニーリング温度を表1に示す。

【0085】

【表1】

表1. 本研究に使用されたプライマーおよびPCR-SSCP条件

名称	プライマー	位置	断片 サイズ(bp)	アニーリング 温度	電気泳動 温度	電気泳動 時間
CD19proAF	AGAAAGTGGGTCTCTTGGGT	プロモーター	340	60°C	15°C	90min
CD19proAR	AAGCCAGGCACAGTGGTACA	プロモーター		60°C		
CD19proBF	TCAAGCGATCCTTCTACCTC	プロモーター	378	60°C	25°C	90min
CD19proBR	CCTGTAATCCCAGCTACTTA	プロモーター		60°C		
CD19proCF	GTGATCTCGGCTCACTGCAA	プロモーター	419	60°C	10°C	90min
CD19proCR	GCACTCAACCATGGGTGTCT	プロモーター		60°C		
CD19ex1F	AGACACCCATGGTTGAGTGC	プロモーター	223	60°C	15°C	80min
CD19ex1R	CTCAGTTTCCAGCCTCAATC	イントロン1		60°C		
CD19ex2AF	AGTCCTCGCTCTATAACCTG	イントロン1	273	60°C	15°C	90min
CD19ex2AR	CTGTTGAGAGACGTTGAAGA	エキソン2		60°C		
CD19ex2BF	AGGCCTGGGAATCCACATGA	エキソン2	208	60°C	24°C	90min
CD19ex2BR	CTTCTGTCCATGGTGGCCTC	イントロン2		60°C		
CD19ex3F	TCTCCTGGGTGTCTCTGCAT	イントロン2	294	60°C	10°C	90min
CD19ex3R	CTGTCTCTGGACCCAGCTT	イントロン3		60°C		
CD19ex4AF	TGAGGATCAGGCTTTCCTTG	イントロン3	215	60°C	13°C	90min
CD19ex4AR	CCGTCTCCATTACCCACATA	エキソン4		60°C		
CD19ex4BF	CATTGCTGAGCCTAGAGCTG	エキソン4	224	60°C	10°C	90min
CD19ex4BR	GGCTCCACTTCTTCCAGTA	イントロン4		60°C		
CD19ex5F	CCTGGGGTCCCTCGTCTCATA	イントロン4	230	60°C	15°C	60min
CD19ex5R	GATGGTTGTCAAGGACTGGGC	イントロン5		60°C		
CD19ex6F	TGTTGAACCAAGTGACCTCC	イントロン5	189	60°C	15°C	60min
CD19ex6R	AGTGAAGGTGGAGGGTGTTA	イントロン6		60°C		
CD19ex7F	ACAGAATCTTGAAGTGGGTCC	イントロン6	239	60°C	15°C	80min
CD19ex7R	ATTGGAGGGATGAGGAGAGT	イントロン7		60°C		
CD19ex8F	CCAAACATCCTTCCCGTG	イントロン7	243	60°C	15°C	70min
CD19ex8R	TCCACTATTCCGGGCCACATA	イントロン8		60°C		
CD19ex9F	TCTGTGGCCGAATAGTGGA	イントロン8	259	60°C	25°C	60min
CD19ex9R	GTGCACTCTAGAGGGGTGTC	イントロン9		60°C		
CD19ex10F	CCTGTGGAATCCCATGAGACA	イントロン9	168	60°C	20°C	75min
CD19ex10R	GAGTGTACACAGCGCTGCAAT	イントロン10		60°C		
CD19ex1112F	ATTGCAGCGCTGTGACACTC	イントロン10	338	60°C	15°C	80min
CD19ex1112R	GTTGGATCTGGTGTCAAGGCT	イントロン12		60°C		
CD19ex1314F	CATGCCCTAGCCTCCAATTC	イントロン12	397	60°C	10°C	80min
CD19ex1314R	ATCCGTGCCATATCTCCCTCC	イントロン14		60°C		
CD19ex15F	CATAGCCTGGATCTCCTCAA	イントロン14	181	60°C	10°C	50min
CD19ex15R	AGGAATACAAAGGGGACTGG	エキソン15		60°C		

【0086】これらは、ヒトCD19のゲノムDNA配列に従って設計された(GenBank 受付番号M84371)。夫々のエクソンは、隣接するイントロン配列に特異的なプライマーを設定して増幅した。また、これまでの研究から、当該方法に最適な断片サイズは200-400bpであることが示唆されていることから(文献49, 50参照)、エクソン2および4は2つの断片に分割し、エクソン11と12および13と14は、夫々1つの断片として増幅した。一段階のPCRでは増幅効率が低いので、プロモーター領域は二段階のPCR法を用いて分析した。第1のプライマーセットは、ロングPCRを用いて-1351から136を増幅するために設計した。最初の変性(96°C、10分)の後、変性(96°C、1分間)、アニーリング(58°C、30秒)および伸長反応(72°C、3分)を35サイクルで行う条件により、サーマルサイクラー(Thermal cycler MP; Takara, Kyoto, Japan)を用いてPCR増幅を行った。PCR-SSCPのために、得られた長い断片を重複する3つの断片(300-450bp)に分割した。PCR増幅は、最初の変性(96°C、10分)の後、変性(96°C、30

秒)、アニーリング(60°C、30秒)および伸長反応(72°C、30秒)を35サイクルで行う条件により、サーマルサイクラー(Thermal cycler MP; Takara または GeneAmp PCR system 9600; Perkin-Elmer Applied Biosystems; Foster City, CA)を用いてPCR増幅を行った。このような方法により-1050bpまでのプロモーター領域が分析された。

【0087】この増幅されたDNAをPCR-SSCP法を用いて分析した。PCR産物を含有する1μLの溶液を、7μLの変性溶液(95%のホルムアミド、20mMのEDTA、0.05%のプロモフェノールブルー、0.05%のキシレンシアノールFF)と混合した。この混合物を96°Cで5分間変性し、直ちに氷上で冷却した。1μLの該混合物を7.5%のポリアクリルアミドゲル(アクリルアミド:ビスアクリルアミド=49:1)を用いてエクソン15を分析し、10%のポリアクリルアミドゲル(アクリルアミド:ビスアクリルアミド=49:1)を用いてその他の部分を分析した。より良好な分離のために、エクソン2Bと4Aを分析するためのゲルには、10%のグリセロールを添加した。電気泳動は0.5×TBE(4

5mM トリスボレート[pH8.0]、1mM のEDTA)中において、20mA/ゲルの定電流下で、一定温度調節系を具備するミニゲル電気泳動装置(90×80×1mm、AE-6410およびAE-6370;ATTO、東京)を用いて行った。最適温度および電気泳動時間は、予備実験により決定した。当該ゲルにおける一本鎖DNA断片を銀染色(第一純薬、東京)により可視化した。

【0088】(4)PCR制限断片長多型(以下、PCR-RFLPと称す)

イントロン14におけるIVS14-30C>T多型の遺伝子型の決定は、PCR-RFLP法を用いて行った。特異的プライマーセット(CD19-3' UTR:5'-AGAGGGAA CAGCGTTCCTAG-3'、CD19ex15R:5'-AGGAATACAAAGGGGACTCG-3')を使用して多型部位を含むCD19遺伝子からの256塩基対断片を増幅した。また、この増幅は前述したPCR-SSCPと同じ条件を用いた。PCR反応後に、増幅産物を、2時間、BamHIにより消化し、更に、SYBRゴールド(商品名サイバーゴールド、Molecular probes, Inc., Engene, OR)染色による10%のポリアクリルアミドゲル上での分析を行った。

【0089】(5)直接シーケンス法

PCR産物を増幅し、上述のPCR-SSCPと同様のプライマーを使用して、センス鎖およびアンチセンス鎖の両方について直接シーケンスを行った。ABI310またはABI377シーケンサー(ABI PRISM, PE Biosystems)を使用し、製造者の指示に従って、ダイターミネーター法を用いて(ABI PRISM™ dRhodamine Terminator Cycle Sequencing-Ready Reaction Kit)PCR産物の蛍光を基にした自動サイクルシーケンシングを行った。

【0090】(6)ジヌクレオチド反復多型の遺伝子型決定

3' UTRに含まれるジヌクレオチド反復多型の遺伝子型の決定は、PCR増幅後、シーケンサーとGENSCAN™ソフトウェアを用いて行った。多型部位を含む256塩基対断片をFamまたはHex標識CD19-3' UTR FプライマーおよびCD19ex15Rプライマーを使用して増幅した。また、該増幅は上述のPCR-SSCPと同じ条件で行った。その増幅産物を、4%のポリアクリルアミドゲル(アクリルアミド:ビスアクリルアミド=19:1)上でABI377シーケンサー(ABI-PRISM, PE Biosystems)を使用して泳動した。PCR産物を含有する1.5μLの溶液を、2.5μLの99.5%のホルムアミド、0.5μLのロード用緩衝液(50mg/mLのブルーデキストラン、25mMのEDTA)および1.0μLのジーン・スキャン(Gene Scan;登録商標)-500[ROX]サイズ・スタンダード(ABI-PRISM, PE Biosystems)の1.0μLと混合した。当該混合物を96℃で2分間変性し、直ちに氷上で冷却した。その混合物の2μLを、4%のポリアクリルアミドゲルに添加した。データ

はABI377コレクションソフトウェアで回収し、サイズ分析はジーン・スキャン-500ROX(Genescan-500ROX)をサイズスタンダード(ABI-PRISM)として使用して行った。

【0091】(7)統計学的解析

日本人患者と健常者は、ケースコントロール関連解析により比較した。陽性率は、個体総数における対立遺伝子(ホモ接合体およびヘテロ接合体)を有した個体の割合として定義した。カイ2乗検定とフィッシャーの直接確率計算法を使用して、CD19多型と夫々の疾患に対する感受性との関連性、またはCD19多型と日本人集団における臨床学的特徴との関連性を解析した。個々の対立遺伝子の有無を比較するためのP値は、13を乗じることによって対立遺伝子数で補正を行った(補正後のP値は P_{corr} と記す)。即ち、9種のSNPsと5個の対立遺伝子を持つ10種類の反復配列多型が解析された(即ち、9+5-1)。

【0092】コーカソイドSLE家系は、伝達不平衡試験(以後、TDTと略す)を使用して通常と同様に解析した(文献51参照)。2または3人の罹患した子供を持つ家系では、第1子のみを解析のために選択した。TDTの有意性は、NcNemar's検定を使用して検定した。 χ^2 値は以下の式により計算した:

$$\chi^2 = (T - NT)^2 / (T + NT)$$

ここで、Tは遺伝された対立遺伝子の数であり、NTは遺伝されなかった対立遺伝子の数である。ハプロタイプ頻度および連鎖不平衡パラメータはEHプログラムを使用したタイピング結果から評価した(文献52参照)。相対的連鎖不平衡(以後、RLDと略す)値は、連鎖不平衡

(以下、LDと略す)の可能な限りの最大値(LD>0の場合)または可能な限りの最小値(LD<0の場合)の絶対値に対するLDの割合として定義される。その結果として、RLDは-1から1までの範囲で変化する。

【0093】2. 結果

(1)CD19多型性の同定

CD19翻訳領域の全長、プロモーター領域(即ち、-1050bp)および3'非翻訳領域(即ち、3'-UTR)の系統的な変位スクリーニングを、日本人健常者32例と患者36例(即ち、SLE患者16例、RA患者16例およびCVID患者4例)からのゲノムDNAサンプルについて、PCR-SSCPを使用して行った。検出された変異のヌクレオチド配列は、直接シーケンス法を用いて決定した。スクリーニングを通して、翻訳領域における3つのSNPsと、エクソン-イントロン接合部に挟まれたイントロンにおける2つのSNPsと、プロモーター領域内の4つのSNPsと、更に3'UTRにおけるGT反復多型が同定された(図5)。図5に、ヒトCD19遺伝子のゲノム配置および日本人において検出された変異を示す。図5においてボックスはエクソンを示す。当該変異の名称は文献に基づいた(文

献53, 54参照)。共通の変異以外の突然変異は、CVID患者においては検出されなかった。

【0094】(2)日本人におけるSLEとCD19変異との関連性

次に発明者らは、(1)で検出されたCD19の多型のうちのどれが日本人集団におけるRA、SLEおよびクローン病の感受性に関連しているのかを分析するため

に、ケースコントロール解析を行った。RA患者127*

表2. RA患者、SLE患者、クローン病患者および健康人対照におけるCD19 SNPsの陽性率

置換			RA (n=127)		SLE1 (n=87)		クローン病 (n=156)		対照 (n=247)	
位置	ヌクレオチド	アミノ酸								
プロモーター	-866A>G		3	(2.4)	4	(4.6)	2	(1.3)	10	(4.0)
プロモーター	-499G>T		45	(35.4)	39	(44.8)	63	(40.4)	109	(44.1)
プロモーター	-303C>T		4	(3.1)	6	(6.9)	5	(3.2)	7	(2.8)
プロモーター	-16G>A		0	(0)	0	(0)	3	(1.9)	3	(1.2)
エキソン3	c.406C>T	L136L	3	(2.4)	6	(6.9)	8	(5.1)	9	(3.6)
エキソン3	c.520G>C	V174L	25	(19.7)	18	(20.7)	30	(19.2)	48	(19.4)
エキソン4	c.705G>T	P235P	53	(41.7)	23	(26.4) ^{a1}	70	(44.9)	104	(42.1)
イントロン12	IVS12+17A>G		1	(0.8)	0	(0)	0	(0)	5	(2.0)
イントロン14	IVS14-30C>T		55	(43.3)	26	(29.9) ^{a2}	53	(34.0)	107	(43.3)

括弧内はパーセンテージを示す。

^{a1} $\chi^2 = 6.70$, df = 1, P = 0.0096, $P_{corr} = 0.12$ (2×2分割表からの χ^2 検定)

^{a2} $\chi^2 = 4.85$, df = 1, P = 0.028, $P_{corr} = 0.36$ (2×2分割表からの χ^2 検定)

【0097】エクソン4におけるc. 705T (P235P) (P=0.0096, P_{corr} =0.12、オッズ値 [OR] = 0.49、95%信頼区間 [CI] : 0.29-0.84) と、イントロン14におけるIVS14-30T (P=0.028, P_{corr} =0.36、OR=0.56、95%CI: 0.33-0.94) は、SLEとのネガティブな関連性が示された。その他

*例、SLE患者87例、クローン病患者156例および日本人健康者247例について、これらの多型の遺伝子型を決定した。

【0095】表2は、プロモーターおよび翻訳領域において検出されたCD19のSNPsの陽性率を示す。

【0096】

【表2】

の有意な関連性は、他のSNPsの何れかとSLEとの間でも、他のSNPsの何れかとRAおよびクローン病との間にも観察されなかった。

【0098】表3は、3' UTRの2塩基反復多型の頻度を示す。

【0099】

【表3】

表3. RA患者、SLE患者、クローン病患者および健康人対照
における3'UTR 2塩基反復多型の頻度

c.*132 (GT) _n	RA (n=127)	SLE1 (n=87)	SLE2 (n=99)	クローン病 (n=156)	対照 (n=247)
遺伝子型頻度					
12/12	74 (58.3)	35 (40.2) ¹⁾	47 (47.5)	80 (51.3)	126 (51.0)
12/13	9 (7.1)	12 (13.8)	12 (12.1)	22 (14.1)	36 (14.6)
12/14	20 (15.7)	19 (21.8)	23 (23.2)	33 (21.1)	52 (21.1)
12/15	0 (0)	0 (0)	4 (4.0)	0 (0)	2 (0.8)
12/18	9 (7.1)	10 (11.5)	7 (7.1)	9 (5.8)	11 (4.5)
13/13	1 (0.8)	3 (3.5)	1 (1.0)	0 (0)	1 (0.4)
13/14	6 (4.7)	0 (0)	1 (1.0)	6 (3.8)	8 (3.2)
13/15	0 (0)	0 (0)	2 (2.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
13/18	1 (0.8)	1 (1.1)	1 (1.1)	2 (1.3)	1 (0.4)
14/14	5 (3.9)	3 (3.5)	0 (0)	3 (1.9)	5 (2.0)
14/18	2 (1.6)	4 (4.6)	1 (1.1)	1 (0.6)	4 (1.6)
15/18	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0.4)
対立遺伝子陽性率					
12 (+)	112 (88.1)	76 (87.4)	96 (93.9)	144 (92.3)	227 (91.9)
13 (+)	17 (13.4)	16 (18.4)	17 (17.2)	30 (19.4)	46 (18.6)
14 (+)	33 (26.0)	26 (29.9)	25 (25.3)	43 (27.7)	69 (27.9)
15 (+)	0 (0)	0 (0)	6 (6.1) ⁴⁾	0 (0)	3 (1.2)
18 (+)	12 (9.4)	15 (17.2) ³⁾	9 (9.1)	12 (7.7)	17 (6.9)
対立遺伝子頻度					
12	186 (73.2)	111 (63.8) ³⁾	140 (70.7)	224 (71.8)	353 (71.5)
13	18 (7.1)	19 (10.9)	18 (9.1)	30 (9.6)	47 (9.5)
14	38 (15.0)	29 (16.7)	25 (12.6)	46 (14.8)	74 (15.0)
15	0 (0)	0 (0)	6 (3.0)	0 (0)	3 (0.6)
18	12 (4.7)	15 (8.6)	9 (4.5)	12 (3.8)	17 (3.4)

SLE患者 対 対照:

¹⁾ $\chi^2 = 19.0$, $df = 10$, $P = 0.04$, $P_{corr} = 0.36$ (2×11分割表からの χ^2 検定)

²⁾ $\chi^2 = 8.0$, $df = 1$, $P = 0.005$, $P_{corr} = 0.065$ (2×2分割表からの χ^2 検定)

³⁾ $\chi^2 = 9.8$, $df = 4$, $P = 0.04$, $P_{corr} = 0.36$ (2×5分割表からの χ^2 検定)

⁴⁾ $\chi^2 = 4.8$, $df = 1$, $P = 0.03$, $P_{corr} = 0.39$ (2×2分割表からの χ^2 検定)

【0100】c.*132 (GT)₁₈ (即ち、cDN A配列における終止コドンの3'塩基から数えて132番目の塩基から始まる18回のGT反復をコードする対立遺伝子)の陽性率は、健康者(17/247、6.9%)と比較して、SLE(15/87、17.2%)の方が有意に高かった($P = 0.005$, $P_{corr} = 0.065$, $OR = 2.82$, 95%CI: 1.37-5.79)。また、SLE1と対照群との間の有意差が、c.*132 (GT)₁₈の対立遺伝子頻度($\chi^2 = 7.6$, $df = 1$, $P = 0.006$, $P_{corr} = 0.078$)、遺伝子型の分布($\chi^2 = 19.0$, $df = 10$, $P = 0.04$, $P_{corr} = 0.36$)および対立遺伝子頻度($\chi^2 = 9.8$, $df = 4$, $P = 0.04$, $P_{corr} = 0.36$)において得られた。この関連性が追試できるか否かを試験するために、GT反復多型性について独立したSLE患者群(即ち、SLE2)を解析にした。SLE2におけるc.*132 (GT)₁₈の陽性率はSLE1

よりも低いものであったが、c.*132 (GT)₁₅の陽性率は有意な増加が得られた($\chi^2 = 4.8$, $df = 1$, $p = 0.03$, $P_{corr} = 0.39$)。

【0101】これらの結果から、発明者らは、そのGT反復数が15以上である場合に、3'UTRにおけるGT反復がSLEに関連すると考えた。従って、c.*132 (GT)₁₅₋₁₈の陽性率および頻度を、SLE1、SLE2および対照において比較した(表4)。c.*132 (GT)₁₅₋₁₈の陽性率は、SLE1($P = 0.016$)およびSLE2($P = 0.049$)の両群において有意に増加した。2つの群を合わせた場合には、更に顕著な相違が対照群との間で観察された($P = 0.0096$)。また、c.*132 (GT)₁₅₋₁₈対立遺伝子の頻度は、SLEにおいて有意に高かった($P = 0.012$)。

【0102】

【表4】

表4. SLE患者と健康人対照におけるc.*132(GT)₁₅₋₁₈の頻度の比較

c.*132(GT) _n	SLE1 (n=87)	SLE2 (n=99)	総SLE (n=186)	対照 (n=247)
対立遺伝子陽性率				
15または18 (+)	15 (17.2)	15 (15.1)	30 (16.1)	20 (8.1)
15 (-) 及び 18 (-)	72 (82.8)	84 (84.8)	156 (83.9)	227 (91.9)
	P=0.016 ¹⁾	P=0.049 ²⁾	P=0.0096 ³⁾	
対立遺伝子頻度				
12, 13, 14	159 (91.4)	183 (92.4)	342 (91.9)	474 (96.0)
15, 18	15 (8.6)	15 (7.6)	30 (8.1)	20 (4.0)
	P=0.020	P=0.056	P=0.012	

¹⁾OR=2.37, 95%CI: 1.17-4.78, ²⁾OR=2.03, 95%CI: 1.00-4.10,³⁾OR=2.18, 95%CI: 1.21-3.94

【0103】RAおよびクローン病については、該GT反復多型との有意な関連性は観察されなかった。

【0104】(3) 多型部位間の連鎖不平衡

SLEとの有意な関連を示した多型部位c. 705、IVS14-30およびc. *132の間の関係を検討するために、健康な日本人個体の遺伝子型決定の結果に基づいて解析した。有意な連鎖不平衡がCD19c. 705TとIVS14-30Tの間で観察された(相対的連鎖不平衡値[RLD]=0.83、 $\chi^2=93.8$ 、 $P<10^{-10}$)。加えて、強い関連性が、c. 705Gとc. *132(GT)₁₈の間(RLD=1.0、 $\chi^2=8.2$ 、 $P=0.004$)、およびc. 705Gとc. *132(GT)₁₅の間(RLD=0.84、 $\chi^2=1.12$ 、 $P=NS$)に観察されたが、この対立遺*

*伝子を有する個体数が少ないために、後者に統計学的な有意差は得られなかった。

【0105】(4) 臨床的特徴との関連性

次に、発明者らは、GT反復多型がSLEの臨床学的特徴と関連するか否かを解析した。興味深いことに、c.

*132(GT)₁₅₋₁₈ 対立遺伝子を持たない患者に比較して、c. *132(GT)₁₅ またはc. *132(GT)₁₈ を持つ患者の方が抗Sm抗体を有する可能性は低かった($P=0.02$)。発症年齢、ネフロパシーの有無、神経学的異常(発作または精神病)、漿膜炎、低補体血症または抗dsDNA抗体等のパラメータについては関連は観察されなかった(表5)。

【0106】

【表5】

表5. SLE患者におけるCD19c.*132(GT)₁₅₋₁₈対立遺伝子の有無と臨床的特徴の関連分析

臨床的パラメータ	c.*132(GT) ₁₅₋₁₈		P
	有り (n=30)	無し (n=156)	
発症年齢<20	6/28 (21.4)	50/156 (32.1)	NS*
ネフロパシー	20/27 (74.1)	88/154 (57.1)	NS
CNSループス	7/28 (25.0)	24/153 (15.7)	NS
漿膜炎	4/26 (15.4)	24/149 (16.1)	NS
低補体血症	17/27 (63.0)	103/154 (66.9)	NS
抗dsDNA	19/26 (73.1)	122/150 (81.3)	NS
抗Sm	1/28 (3.6)	39/152 (25.7)	0.02

*NS: 有意差なし

【0107】3. 考察

本研究において、発明者らは、ヒトCD19の多くのヌクレオチド配列変異を同定し、その中の3つが、SLEと有意に関連性のあることを示した。2つはSLEと負の関連性を示し、残りは、有意な正の関連性を示した。

先の2つは後者と負の連鎖不平衡にあった。更に、イントロンにおける同義置換および1塩基置換をコードするSNPsは、何らかの機能的変化に関連している可能性は小さいと考えられるので、3'UTRのGT反復多型が、主に機能的に重要である可能性が高いと考えられ

る。

【0108】これまでの研究では、CD19の遺伝子多型がSLEに関連しているという報告はない。例えば、イタリアのケースコントロールスタディにおいて解析された多型は、本発明者らが今回報告した多型と同じものである可能性があるが、その研究では、SLEとの関連は認められなかった。このようなことは、CD19の3' UTRのSLEとの関連は日本人や近隣の集団に固有の特徴である可能性を示唆している。従って、日本人以外のアジア系集団におけるこの関連性の有無を解析することも興味深いことであろう。

【0109】現時点では、伸長されたGT反復対立遺伝子がどのようにSLEと関連しているのかは推論でしかない。仮に、そのような対立遺伝子が末梢におけるCD19のより高い発現レベルに関連するのであれば、自己抗原に対する低親和性自己抗体の産生を導くようなB細胞活性化の閾値の低下が生じるかもしれない。CD19の過剰発現したマウスからのB細胞の表現型は、SHP-1タンパクチロシンホスファターゼ(文献55, 56参照)やLyn(文献57参照)に欠陥のあるB細胞に類似する。これら2つの分子はB細胞の反応における負の調節因子であるため、そのシグナル閾値の低下が自己免疫の誘導を引き起こしているのかもしれない。或いは、仮に、c.*132(GT)₁₅₋₁₈ 対立遺伝子が、未熟B細胞における低い表面CD19発現に関与しているならば、骨髄における自己抗原に対する寛容誘導の欠陥を引き起こすかもしれない(文献19参照)。末梢B細胞におけるCD19の発現レベルは、少数のSLE患者においては僅かに減少したと報告されている(文献29参照)。実際に、CD19欠失マウスの大部分は抗核抗体を示す(Sato S., personal communication)。従って、おそらく未熟B細胞におけるBCRシグナリング減少のために、欠陥のあるCD19が自己抗原に対する寛容誘導の不足を導くという機序も一つの可能性として考えられる(文献58参照)。例えば、負の調節因子の遺伝子多型が不十分な負のシグナルをもたらす場合や、他の遺伝的および/または環境の状態が提供される場合と組み合わせ、SLE患者では、低いレベルのCD19発現をもたらす多型が自己反応性B細胞の存続と活性化を引き起こす可能性も考えられる。

【0110】本研究において、c.*132(GT)₁₅₋₁₈ 対立遺伝子を有するSLE患者が抗Sm抗体を有している可能性が顕著に低いことが観察された。特に興味深いことには、CD19の発現レベルが、抗Sm重鎖導入遺伝子を発現しているマウスにおいて、B-1およびB-2細胞群の分化や自己抗体産生を調節することが最近報告された(文献59参照)。従って、CD19発現レベルが、核自己抗原に特異的なB細胞の分化および活性化の調節に関連している可能性がある。

【0111】多くの多型部位が検出され、且つ検出され

た全対立遺伝子の夫々について統計学的解析が行われたので、P値は、多重比較のための補正の後で統計学的な有意性には到達しなかった。しかしながら、GT反復多型の有意な関連が、RAおよびクローン病においてではなく、SLEの2つの独立群においてともに観察されていることから、この関連が偽陽性のものとは考えられない。

【0112】例2. FCGR2B遺伝子における多型とヒト全身性エリテマトーデスとの関連性

FCGR2B遺伝子における多型とヒト全身性エリテマトーデスとの関連性を解析するために、FCGR2Bの変異スクリーニングをPCR一本鎖構造多型(PCR-single strand conformation polymorphism;SSCP)を使用して行った。

【0113】図6に示すように、FcγRIIBタンパクは、シグナルペプチド(SP)、2つのIg様細胞外ドメイン(図6では、夫々、EC1およびEC2と記す)、膜貫通領域(図6ではTMと記す)および細胞質末端(図6では、夫々、C1、C2およびC3と記す)からなる(図6)。エクソン特異的プライマーセットとゲノムDNA鋳型を使用しての翻訳領域全長の初期変異スクリーニングを経て、4つの可能な変異部位がエクソン4とエクソン5において検出された(データには示さず)。しかしながら、エクソン1から5を通して、FcγRIIBのアミノ酸およびヌクレオチド配列は、FcγRIIAとIICとも高い相同性を有しており(文献61, 62参照)、従って、変異の幾つかは実際にはFCGR2Aまたは2C多型に由来する可能性もあった。

【0114】以上の状況を考慮して、FCGR2B遺伝子のみを増幅するために、末梢血単核細胞から抽出したRNAを鋳型として調製したcDNAを鋳型として使用して二段階のPCRを行った。従来報告されている通り、大きさの異なる2つの断片が最初のPCRで観察され、これはスプライシングによる変異体FcγRIIB1およびFcγRIIB2であると考えられた(文献63参照)。

【0115】1. 方法

(1) 患者および健常者

非血縁日本人であるSLE患者75例と健常者94例について解析した。SLE患者は、年齢16歳から78歳まで(平均年齢40.0±13.7歳)の男性12例および女性63例である。また、これらのSLE患者は、東京大学医学部附属病院および順天堂大学病院に通院中の患者である。健常者は、年齢22歳から50歳まで(平均年齢31.3±8.3歳)の49例の男性および45例の女性であり、東京大学および日本赤十字中央血液センターの研究者、研究室職員および学生からなる。日本の関東地域の住民は、遺伝的背景に関して比較的均質であることが示されているので(文献48参照)、本研究で採用するケースコントロールスタディが可能となる。

また、本研究は、東京大学および順天堂大学の研究倫理審査委員会により承認された。

【0116】(2) RNAおよびゲノムDNA

RNAは、RNeasy・ミニ・キット (Qiagen, Hilden, Germany) を使用し、SLE患者と健常者の末梢血単核細胞から精製し、cDNAに逆転写した。また、ゲノムDNAは、患者および健常者の末梢血白血球から、QIAamp・ブラッド・キット (QIAamp Blood kit, Qiagen, Hilden, Germany) を使用して精製した。

【0117】(3) FCGR2B遺伝子型の決定

FCGR2Bエクソン4、エクソン5およびエクソン6の遺伝子型の決定は二段階のPCRとSSCP法を使用して行った。最初のPCRのためのプライマーは、5' UTR (2B 5' UTR-F: 5' -GAGAAGGCTGTGACTGCTGT-3') およびエクソン8のITIM領域 (2BITIM-R: 5' -CGGCTGCATGAGAAGTGAAT-3') に設計し、FCGR2Bの944bpのcDNA断片を増幅した (図6)。PCR条件は以下の通りであった: 0.2 μLのcDNA、0.2 μMの各プライマー、0.4 mMのdNTPs、2 mMのMgCl₂、2.5 UのLA Taq DNAポリメラーゼ (タカラ社) を含有する50 μL反応液。最初の変性 (96℃で3分) の後、変性 (96℃で30秒)、アニーリング (60℃で30秒)、伸長 (72℃で90秒) のPCR反応を35サイクル行い、更に最後の伸長反応 (72℃で5分) を行った。最初のPCR産物は、直接シーケンス法によりFCGR2Bであることを確認した。

【0118】続いて、増幅された断片を第2のPCR反応のための鋳型として使用し、2つのプライマーセットを用いて、即ち、その1つは (2Bエクソン3-F: 5' -GCATCTGACTGTGCTTTCTG-3'、2Bエクソン4-R: 5' -CTTGGACAGTGATGGTCACA-3') を用いてエクソン4全長である275bp断片を増幅し、もう1つは (2Bエクソン4.5-F: 5' -TCCAAGCTCCCAGCTCTTCA-3'、2Bエクソン6-R: 5' -TCGTTTCACAGGAGGGTCT-3') を用いてエクソン5およびエクソン6を包含する176bp断片を増幅した (図6)。PCR条件は以下の通りである: 0.5 μLの最初のPCR産物、0.4 μMの各プライマー、0.2 mMのdNTPs、1.5 mMのMgCl₂、1 UのAmpliTaq Gold DNAポリメラーゼ (パーキン・エルマー・アプライド・バイオシステムズ、Norwalk, CT, USA) を含有する25 μLの反応液。96℃で10分間の変性の後で、変性 (96℃、30秒)、アニーリング [60℃ (275bp断片の増幅の場合) または62℃ (176bp断片の増幅の場合)、30秒]、伸長反応 (72℃、30秒) のPCR反応を25サイクル行い、更に最後の伸長反応 (72℃、1分) を行った。

【0119】増幅された275bpと176bpのDNA断片は、SSCP法を用いて、我々の既報に記載され

ている通りに分析した (文献40, 69参照)。10%のポリアクリルアミドゲル (アクリルアミド: ビス = 49:1) を使用しての電気泳動を21℃で90分間、および10℃で75分間で夫々行った。分離された断片を銀染色で可視化した。

【0120】(4) FCGR2A、3Aおよび3Bの遺伝子型の決定

FCGR2A-131H/R、FCGR3A-176F/VおよびFCGR3B-NA1/2を、75例のSLE患者と94例の健常者からのゲノムDNAを用いて決定した。FCGR2A-131H/Rの遺伝子の決定は、ミスマッチプライマーを用いたPCR-RFLPを使用して行い (文献40参照)、FCGR3A-176/Vの遺伝子の決定はPCR-SSCPを使用して行い (文献40参照)、FCGR3B-NA1/2の遺伝子の決定はPCR-PHFA法 (文献64参照) とPCR-SSP法 (文献65参照) を用いて行った。

【0121】(5) 直接シーケンス法

FCGR2Bの直接シーケンスをABI PRISMTM 310遺伝子アナライザー (パーキン・エルマー・アプライド・バイオシステムズ) とダイーターミネーター法を用いて行った。

【0122】(6) 統計学的解析

関連解析のための計算はマッキントッシュ用のStat View-J 4.11 (Abacus Concepts Inc., Berkeley, CA, USA) を使用して行った。4つのFcγR遺伝子多型の多型とSLE感受性の関連性についてχ²検定を用いて解析した。サンプルの数が少ない場合には、フィッシャーの直接確率計算法を使用した。ハプロタイプの頻度および連鎖不平衡パラメータの推定には、EHプログラムを使用した。

【0123】2. 結果

2つのプライマーセットにより増幅された第2のPCR産物は (図6)、2つの変異部位、エクソン4におけるc. 612G>A (同義置換) およびエクソン6におけるc. 772T>G (Y258D) を含み、これらは、ヒトBリンパ芽球細胞株Raji (文献66参照) (変異部位の名称は文献53に基づく) を用いた予備実験において検出された変異部位として報告されている。2対立遺伝子多型 (SNP) がPCR-SSCP法によりエクソン5において検出され (図7)、更に、直接シーケンス法により、FcγRIIBの膜貫通領域内のコドン232での非保存的なアミノ酸置換 (I232T) を引き起こす新規のSNP c. 695T>C (エクソン5) であることを明らかにした。

【0124】表6は、75例のSLE患者および94例の健常者のFCGR2B-232I/T遺伝子型の頻度を示す。当該遺伝子型の頻度は、SLEと健常者の間で有意に異なる (χ² = 6.4、P = 0.04)。SLEの進展に関するT/TとI/T遺伝子型のオッズ値 (O

10

20

30

40

50

R)は、I/I遺伝子型に対して、夫々、3.9 ($\chi^2 = 6.3$, $P = 0.02$, 95%信頼区間[CI]: 1.4-11.2) および 1.1 ($\chi^2 = 0.1$, $P = 0.73$, 95%CI: 0.6-2.2)であり、232T/T遺伝子型とSLEとの有意な関連が示された。反対に、232I対立遺伝子の陽性率は、当該患者において有意に減少した ($\chi^2 = 6.3$, $P = 0.02$, OR: *

*0.3, 95%CI: 0.1-0.7)。更に、232Iと232Tの対立遺伝子頻度も、SLEと健常者の間で有意に異った ($\chi^2 = 5.1$, $P = 0.02$)。健常者の遺伝子型頻度は、ハーディーワインバーグ平衡に適合した。

【0125】

【表6】

表6. 日本人SLE患者と健常人対照におけるFCGR2B c.695T>C(232I/T)多型の頻度

	SLE (n=75)	対照 (n=94)	χ^2 値	P値
遺伝子型頻度				
232 I/I	38 (50.7)	57 (60.6)	6.4	0.04 ^a
232 I/T	24 (32.0)	32 (34.1)		
232 T/T	13 (17.3)	5 (5.3)		
対立遺伝子陽性率				
I 有り	62 (82.7)	89 (94.7)	6.3	0.02 ^b
T 有り	37 (49.3)	37 (39.4)	1.7	0.19 ^c
対立遺伝子頻度				
I 対立遺伝子	100 (86.7)	146 (77.7)	5.1	0.02 ^c
T 対立遺伝子	50 (33.3)	42 (22.3)		

括弧内はパーセンテージ数を示す。

^aP値は χ^2 検定3×2分割表(df=2)により算出された。

^bP値はFisher直接計算法により算出された。

^cP値は χ^2 検定2×2分割表(df=1)により算出された。

【0126】発明者らは、次に、FcγRIIB-232I/T多型と、SLE患者における発症年齢、ループス腎炎の有無、抗dsDNAおよび抗Sm等の疾患表現型との関係を分析した。これらの臨床的および免疫学的特徴が陽性または陰性の患者の間に遺伝子型頻度の有意差は観察されなかった（データには示さず）。

【0127】FcγRファミリーの遺伝子が、第一義的にSLEと関連していることを確認するために、FCGR2A-131H/R、FCGR3A-176F/VおよびFCGR3B-NA1/2の遺伝子型を、FCGR2Bについて分析した患者と健常者の同セットにおいて

比較した。FCGR2B遺伝子型の決定には、cDNAサンプルが必要であり、且つcDNAサンプルは大多数の患者においては入手可能であったが、健常者では約半数で入手可能であったことから、分析された個体の数は、発明者らの以前の報告よりも少ない(文献40参照)。表7に示す通り、FCGR2Bを除いて、サンプルのこれらのセットにおいて有意な関連は検出されず、4つのFcγR遺伝子群の中ではFcγRIIBが最もSLEと強く関連することが示された。

【0128】

【表7】

表7. 日本人 SLE 患者と健康人対照における
FCGR2A, FCGR3A および FCGR3B 多型

	SLE	対照	χ^2 値	P 値 ^a
	(n=75)	(n=94)		
遺伝子型頻度				
FCGR2A				
131 R/R	2 (2.7)	3 (3.2)	0.2	0.91
131 R/H	26 (34.7)	35 (37.2)		
131 H/H	47 (62.7)	56 (59.6)		
FCGR3A				
176 F/F	40 (53.3)	48 (48.9)	0.5	0.76
176 F/V	31 (41.3)	44 (46.8)		
176 V/V	4 (5.3)	4 (4.3)		
FCGR3B				
NA 2/2	17 (22.7)	13 (13.8)	2.2	0.33
NA 2/1	36 (48.0)	50 (53.2)		
NA 1/1	22 (29.3)	31 (33.0)		

括弧内はパーセンテージ数を示す。

^aP 値は χ^2 検定 3×2 分割表 (df=2) により算出された。

【0129】これらの4つのFcγR遺伝子群の多型の間の連鎖不平衡を、健康者からのデータを用いて解析したところ、FCGR2BおよびFCGR3B ($\chi^2 = 79.7$, $P < 10^{-6}$) の間、FCGR2AおよびFCGR3A ($\chi^2 = 6.4$, $P = 0.01$) の間で強い連鎖

不平衡が検出されたが、他の組み合わせでは検出されなかった(表8)。

【0130】

【表8】

表8. FCGR2A-131H/R, FCGR2B-232I/T, FCGR3A-176F/V,
および FCGR3B-NA1/NA2 多型のあいだでの
評価されたハプロタイプ頻度および連鎖不平衡

ハプロタイプ	HF ^a (%)	LD ^b (%)	RLD ^c	χ^2 値 (df=1)	P値
(健康な日本人, n=94)					
2B-2A 232I-131H	59.2	-1.6	-0.32	1.6	0.21
232I-131R	18.5	1.6	0.32		
232T-131H	19.0	1.6	0.32		
232T-131R	3.3	-1.6	-0.32		
2B-3A 232I-176F	55.4	-0.7	-0.12	0.3	0.59
232I-176V	22.2	0.7	0.12		
232T-176F	16.9	0.7	0.12		
232T-176V	5.5	-0.7	-0.12		
2B-3B 232I-NA1	59.6	13.3	1.00	79.7	<10 ⁻⁶
232I-NA2	18.1	-13.3	-1.00		
232T-NA1	0.0	-13.3	-1.00		
232T-NA2	22.3	13.3	1.00		
2A-3A 131H-176F	53.2	-3.4	-0.57	6.4	0.01
131H-176V	25.0	3.4	0.57		
131R-176F	19.2	3.4	0.57		
131R-176V	2.6	-3.4	-0.57		
2A-3B 131H-NA1	47.4	0.8	0.06	0.3	0.60
131H-NA2	30.8	-0.8	-0.06		
131R-NA1	12.2	-0.8	-0.06		
131R-NA2	9.6	0.8	0.06		
3A-3B 176F-NA1	40.7	-2.4	-0.22	2.3	0.13
176F-NA2	31.7	2.4	0.22		
176V-NA1	18.9	2.4	0.22		
176V-NA2	8.7	-2.4	-0.22		
(SLE, n=75)					
2B-3B 232I-NA1	50.3	14.7	0.83	58.8	<10 ⁻⁶
232I-NA2	16.4	-14.7	-0.83		
232T-NA1	3.0	-14.7	-0.83		
232T-NA2	30.3	14.7	0.83		

^aHF: 評価されたハプロタイプ頻度。^bLD: 連鎖不平衡。

^cRLD=相対的な連鎖不平衡の値。

【0131】これらの結果は、FCGR2Bが3Bに隣接して位置し、FCGR2Aが3Aに隣接して位置することを示す報告されている物理的地図に一致する。また、該SLE患者において、強い関連が、FCGR2B-232T対立遺伝子と3B-NA2対立遺伝子との間で観察され($\chi^2 = 58.8$, $P < 10^{-6}$)、このことは、より多数のサンプルを用いて、発明者らが以前に報告したFCGR3B-NA2対立遺伝子とSLEの関連と合致する。

【0132】以前に検出されたFCGR3B-NA2対立遺伝子との関連性は、FCGR2B-232T対立遺伝子との連鎖不平衡から生じることが説明されたとはいえ、FCGR3B-NA2が免疫複合体のクリアランスの低さによって独立した寄与を有する可能性もある。そのような可能性を評価するために、FCGR2Bと3Bの2遺伝子座解析を行った。オッズ値(OR)の有意な増加が2B-232T/Tと3B-NA2/2遺伝子型を有する固体においてのみに検出されたが(OR: 3.41, 95%CI: 1.1-10.9, $P = 0.05$)、

2B-232I/T、3B-NA2/2群を含む他の組合せにおいては検出されなかった(図8)。この結果により、FCGR2B多型が一義的であり、FCGR3Bの関連は二次的なものであることが支持された。

【0133】SSCPにより検出されなかった他の変異の存在を除外するために、FCGR2Bの翻訳領域全長の配列を、FCGR2B-232I/I遺伝子型を有する10例の個体、232I/Tを有する10例の個体、および232T/Tを有する20例の個体からのcDNAsを用いて決定した。2つの同義置換、即ち、エクソン3内のc. 216G>T(R72R)およびエクソン4内のc. 612G>A(L204L)が、232-I/Iと232-I/Tの遺伝子型の1個体ずつのみ検出された。一方、以前に報告されたエクソン6におけるc. 772T>G(Y258D)は、その機能が代わる可能性のあるヒトFCGR2Bの変異であるが(文献67参照)、発明者らの対象においては検出されず、また、コーカソイドおよびアフリカ系アメリカ人集団においても希であることが示された。加えて、過去に登録された

配列（夫々、GenBank登録番号AH005422とNM_004001）の間にc. 614TとA（F205Y）の2種が存在するが、発明者らが解析した全サンプルはc. 614A（205Y）のホモ接合体であったことにより、少なくとも日本人においては205Yが高頻度であることが明かとなった。

【0134】更に、発明者らは、HLA-DRB1*1501（文献68参照）およびTNFR2-196R（文献69参照）とFCGR2B多型の相互作用の可能性について解析した。これらは、以前に、日本人SLEとの関連性

が示されている遺伝子である。表9に示す通り、FCG*

表9. SLEに対する感受性における
FCGR2BとHLA-DRB1 lociの相乗効果

組合せ		SLE (n=75)	健康人 対照 (n=89)	χ^2 値	P 値	OR ^c (95%CI ^d)
FCGR2B 232T/T 遺伝子型	HLA-DRB1 *1501 対立遺伝子					
+	+	6 (8.0)	0 (0.0)	8.0	0.004 ^a	20.9 ^a (2.9-152.7)
+	-	7 (9.3)	5 (5.6)	1.8	0.22 ^a	2.3 (0.7-7.4)
-	+	18 (24.0)	13 (14.6)	3.9	0.05 ^b	2.2 (1.0-5.0)
-	-	44 (58.7)	71 (79.8)			1.0

括弧内はパーセンテージ数を示す。

^ap 値は Fisher 直接計算法により算出された。

^bp 値は χ^2 検定2×2分割表(df=1)により算出された。

^cOR=オッズ値。^d95%CI=95%信頼区間。

^eORは2×2分割表における各数値に0.5を足すことにより算出された。

【0136】以上により、発明者らの今回の発見は、FcγRファミリーの中でもFCGR2Bが、日本人集団におけるSLEに対する主要な感受性遺伝子であることを強く示唆する。B細胞の負の調節因子としてのFcγRIIBの役割を明確に証明するインビトロおよび動物実験を考え合わせると、FcγRIIB-232T多型がFcγRIIBの機能低下と関連し、それによってSLEに特有の自己抗体が産生されるという機序が推定される。膜貫通領域におけるFCGR2B-232I/T置換に関連する機能的な相違はまだ推測の域を超えないが、最近、B細胞のアポトーシスの惹起におけるFcγRIIBの膜貫通ドメインの役割が証明されている。従って、FcγRIIB-232I/T多型がアポトーシスのシグナル伝達に影響し、自己抗体を産生するB細胞の存続を可能にし、該自己免疫疾患を引き起こすこと

*R2B-232T/T遺伝子型と、少なくとも1のHLA-DRB1*1501対立遺伝子をともに有する個体のオッズ値（即ち、発症危険率）は、各遺伝子座の独立した影響から予測されたものと比較して非常に高いものであった（OR:20.9, 95%CI:2.9-152.7, P=0.004）。これはこれらの遺伝子の間の相乗効果を示唆する大変興味深い結果である。そのような効果は、FCGR2BとTNFR2の間では観察されなかった（データは示さず）。

【0135】

【表9】

が、1つの可能性として考えられる。今後、この仮説を実験によって検証することは興味深い課題である。

【0137】

【発明の効果】本発明者らは、新たなSLE感受性多型遺伝子を初めて決定した。この決定によって、対象におけるSLE発症の危険率をより詳細に予測することが可能となった。

【0138】また、このような多型遺伝子を含むポリヌクレオチドにより、当該多型遺伝子型を容易に決定することが可能である。また、SLE発症危険率予測方法およびこの方法を行うための装置を使用することにより、SLE発症の危険率を容易に予測することが可能である。

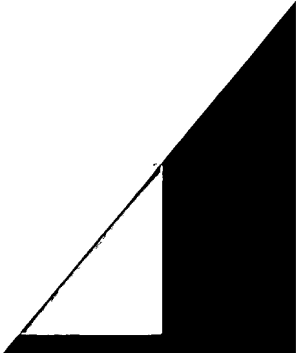
【0139】参考文献

【表10】

- (1) Silman AJ. Rheumatoid arthritis. In: Silman AJ, Hochberg MC, editors. Epidemiology of the rheumatic diseases. Oxford: Oxford University Press 1993; 7-68
- (2) Wolfe F, Kleinheskel SM, Khan MA. Familial vs sporadic rheumatoid arthritis: a comparison of the demographic and clinical characteristics of 956 patients. *J Rheumatol* 1988; 15: 400-4
- (3) Aho K, Koskenvuo M, Tuominen J, Kaprio J. Occurrence of rheumatoid arthritis in a nationwide series of twins. *J Rheumatol* 1986; 13: 899-902
- (4) Silman AJ, MacGregor AJ, Thomson W, Holligan S, Carthy D, Farhan A, et al. Twin concordance rates for rheumatoid arthritis: results from a nationwide study. *Br J Rheumatol* 1993; 32: 903-7.
- (5) Jarvinen P, Aho K. Twin studies in rheumatic diseases. *Semin Arthritis Rheum* 1994; 24: 19-28
- (6) Hochberg MC. The epidemiology of systemic lupus erythematosus. In: DuBois' Lupus Erythematosus, 5th edition. Williams & Wilkins 1997; 49-65, 78-117
- (7) Nadler LM, Anderson KC, Marli G, Bates M, Park E, Daley JF, et al. B4, a human B lymphocyte-associated antigen expressed on normal, mitogen-activated, and malignant B lymphocytes. *J Immunol*, 1983; 131: 244-50.
- (8) Tedder TF, Isaacs CM. Isolation of cDNAs encoding the CD19 antigen of human and mouse B lymphocytes. A new member of the immunoglobulin superfamily. *J Immunol*, 1989; 143: 712-7.
- (9) Zhou LJ, Ord DC, Hughes AL, Tedder TF. Structure and domain organization of the CD19 antigen of human, mouse, and guinea pig B lymphocytes. Conservation of the extensive cytoplasmic domain. *J Immunol*, 1991; 147: 1424-32.
- (10) Uckun FM, Burkhardt AL, Jarvis L, Jun X, Stealey B, Dibirdik I, et al. Signal transduction through the CD19 receptor during discrete developmental stages of human B-cell ontogeny. *J Biol Chem*, 1993; 268: 21172-84.

- (11) Kitanaka A, Ito C, Coustan-Smith E, Campana D. CD38 ligation in human B cell progenitors triggers tyrosine phosphorylation of CD19 and association of CD19 with lyn and phosphatidylinositol 3-kinase. *J Immunol*, 1997; 159: 184-92.
- (12) Xiao J, Messinger Y, Jin J, Myers DE, Bolen JB, Uckun FM. Signal transduction through the $\beta 1$ Integrin family surface adhesion molecules VLA-4 and VLA-5 of human B-cell precursors activates CD19 receptor-associated protein-tyrosine kinases. *J Biol Chem*, 1996; 271: 7659-64.
- (13) Hippen KL, Buhl AM, D'Ambrosio D, Nakamura K, Persin C, Cambler JC. Fc γ R1B1 inhibition of BCR-mediated phosphoinositide hydrolysis and Ca^{2+} mobilization is integrated by CD19 dephosphorylation. *Immunity*, 1997; 7: 49-58.
- (14) Kiener PA, Llobin MN, Rohrschneider LR, Ledbetter JA, Nadler SG, Diegel ML. Co-ligation of the antigen and Fc receptors gives rise to the selective modulation of intracellular signaling in B cells. Regulation of the association of phosphatidylinositol 3-kinase and inositol 5'-phosphatase with the antigen receptor complex. *J Biol Chem*, 1997; 272: 3838-44.
- (15) Engel P, Zhou LJ, Ord DC, Sato S, Koller B, Tedder TF. Abnormal B lymphocyte development, activation, and differentiation in mice that lack or overexpress the CD19 signal transduction molecule. *Immunity*, 1995; 3: 39-50.
- (16) Rickert RC, Rajewsky K, and Roes J. Impairment of T-cell-dependent B-cell responses and B-1 cell development in CD19-deficient mice. *Nature*, 1995; 376: 352-5.
- (17) Sato S, Steeber DA, Tedder TF. The CD19 signal transduction molecule is a response regulator of B-lymphocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995; 92: 11558-62.
- (18) Sato S, Ono N, Steeber DA, Pisetsky DS, Tedder TF. CD19 regulates B lymphocyte signaling thresholds critical for the development of B-1 lineage cells and autoimmunity. *J Immunol*, 1996; 157: 4371-8.

【0141】

【表12】

- (19) Sato S, Miller AS, Howard MC, Tedder TF. Regulation of B lymphocyte development and activation by the CD19/CD21/CD81/Leu 13 complex requires the cytoplasmic domain of CD19. *J Immunol*, 1997; 159: 3278-87.
- (20) Sato S, Steeber DA, Jansen PJ, Tedder TF. CD19 expression levels regulate B lymphocyte development: human CD19 restores normal function in mice lacking endogenous CD19. *J Immunol*, 1997; 158: 4662-9.
- (21) Fehr T, Rickert RC, Odematt B, Roes J, Rajewsky K, Hengartner H, et al. Antiviral protection and germinal center formation, but impaired B cell memory in the absence of CD19. *J Exp Med*, 1998; 188: 145-55.
- (22) Zhou LJ, Smith HM, Waldschmidt TJ, Schwarting R, Daley J, Tedder TF. Tissue-specific expression of the human CD19 gene in transgenic mice inhibits antigen-independent B-lymphocyte development. *Mol Cell Biol*, 1994; 14: 3884-94.
- (23) Inackl M, Sato S, Weintraub BC, Goodnow CC, Tedder TF. CD19-regulated signaling thresholds control peripheral tolerance and autoantibody production in B lymphocytes. *J Exp Med*, 1997; 186: 1923-31.
- (24) Fujimoto M, Poe JC, Inackl M, Tedder TF. CD19 regulates B lymphocyte responses to transmembrane signals. *Semin Immunol*, 1998; 10: 267-77.
- (25) Tuveson DA, Carter RH, Soltoff SP, Fearon DT. CD19 of B cells as a surrogate kinase insert region to bind phosphatidylinositol 3-kinase. *Science*, 1993; 260: 986-9.
- (26) Hugot JP, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Olson JM, Lee JC, Beaugierie L, et al. Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. *Nature*, 1996; 379: 821-3.
- (27) Cornélis F, Fauré S, Martínez M, Prud'homme JF, Fritz P, Dib C, et al. New susceptibility locus for rheumatoid arthritis suggested by a genome-wide linkage study. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998; 95: 10746-50.
- (28) Kinman DM. B-cell abnormalities characteristic of systemic lupus erythematosus. In: Wallace DJ and Hahn BH (eds) *Dubois' Lupus Erythematosus* (5th ed). Williams & Wilkins, Baltimore, 1997; pp195-206.

- (29) Sato S, Hasegawa M, Fujimoto M, Tedder TF, Takehara K. Quantitative genetic variation in CD19 expression correlates with autoimmunity. *J Immunol*, 2000; 165: 6635-43.
- (30) Moser, K. L. *et al.* Genome scan of human systemic lupus erythematosus: evidence for linkage on chromosome 1q in African-American pedigrees. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 14869-14874 (1998).
- (31) Shai, R. *et al.* Genome-wide screen for systemic lupus erythematosus susceptibility genes in multiplex families. *Hum. Mol. Genet.* 8, 639-644 (1999).
- (32) Wakeland, E. K., Wandstrat, A.E., Liu, K. & Morel, L. Genetic dissection of systemic lupus erythematosus. *Curr. Opin. Immunol.* 11, 701-707 (1999).
- (33) Peltz, G. A. *et al.* Human FcγRIII: Cloning, expression, and identification of the chromosomal locus of two Fc receptors for IgG. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 1013-1017 (1989).
- (34) Qiu, W. Q., de Bruin, D., Brownstein, B. H., Pearce, R., Ravetch, J. V. Organization of the human and mouse low-affinity FcγR genes: duplication and recombination. *Science* 248, 732-735 (1990).
- (35) Su, Y. *et al.* Myelin protein zero gene mutated in Charcot-Marie-Tooth type 1B patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 10856-10860 (1993).
- (36) Callanan, M. B. *et al.* The IgG Fc receptor, FcγRIIB, is a target for deregulation by chromosomal translocation in malignant lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97,
- (37) van de Winkel, J. G. J. & Capel, P. J. A. Human IgG Fc receptor heterogeneity: molecular aspects and clinical implications. *Immunology Today* 14, 215-221 (1993).
- (38) van der Pol, W. L. & van de Winkel, J. G. J. IgG receptor polymorphisms: risk factors for disease. *Immunogenetics* 48, 222-232 (1998).
- (39) Ravetch, J. V. & Lanier, L. L. Immune inhibitory receptors. *Science* 290, 84-89 (2000).
- (40) Hatta, Y. *et al.* Association of Fcγ receptor IIIB, but not of Fcγ receptor IIA and IIIA, polymorphisms with systemic lupus erythematosus in Japanese. *Genes Immun.* 1, 53-60 (1999).

- (41) Yuasa, T. *et al.* Deletion of Fcγ receptor IIb renders H-2^b mice susceptible to collagen-induced arthritis. *J. Exp. Med.* 189, 187-194 (1999).
- (42) Nakamura, A. *et al.* Fcγ receptor IIb-deficient mice develop Goodpasture's syndrome upon immunization with type IV collagen: a novel murine model for autoimmune glomerular basement membrane disease. *J. Exp. Med.* 191, 899-905 (2000).
- (43) Bolland, S. & Ravetch, J. V. Spontaneous autoimmune disease in FcγRIIB-deficient mice results from strain-specific epistasis. *Immunity* 13, 277-285 (2000).
- (44) Jiang, Y. *et al.* Genetically determined aberrant down-regulation of FcγRIIB1 in germinal center B cells associated with hyper-IgG and IgG autoantibodies in murine systemic lupus erythematosus. *Int. Immunol.* 11, 1685-1691 (1999).
- (45) Jiang, Y. *et al.* Polymorphisms in IgG Fc receptor IIb regulatory regions associated with autoimmune susceptibility. *Immunogenetics* 51, 429-435 (2000).
- (46) Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, *et al.* The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 1988; 31; 315-24.
- (47) Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, *et al.* The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 1982; 25; 1271-7.
- (48) Tokunaga K, Imanishi T, Takahashi K, and Juji T. On the origin and dispersal of East Asian populations as viewed from HLA haplotypes. In: Akazawa, T. and Szathmary, E.J. (eds), *Prehistoric Mongoloid Dispersals*. Oxford University Press, Oxford, 1996; pp197-97.
- (49) Tsuchiya N, Shiota M, Moriyama S, Ogawa A, Komatsu-Wakui M, Mitsui H, *et al.* MICA allele typing of HLA-B27 positive Japanese patients with seronegative spondylarthropathies and healthy individuals: differential linkage disequilibrium with HLA-B27 subtypes. *Arthritis Rheum*, 1998; 41; 68-73.
- (50) Bannai M, Tokunaga K, Lin L, Kuwata S, Mezda T, Amaki I, *et al.* Discrimination of human HLA-DRB1 alleles by PCR-SSCP (single-strand conformation polymorphism) method. *Eur J Immunogenet*, 1994; 21; 1-9.

- (51) Spielman RS, McGinnis RE, and Ewens WJ. Transmission test for linkage disequilibrium: the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *Am J Hum Genet*, 1993; 52: 506-16.
- (52) Terwilliger JD and Ott J. Handbook of human linkage analysis. Johns Hopkins University Press, Baltimore, 1994; pp188-93.
- (53) Dunnen, JT, Antonarakis SE. Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. *Hum Mutat*, 2000; 15: 7-12.
- (54) Nomenclature for the description of sequence variations. (<http://www.dmd.nl/mutnomen.html>).
- (55) Shultz LD, Schweitzer PA, Rajan TV, Yi T, Ihle JN, Matthews RJ, et al. Mutations at the murine motheaten locus are within the hematopoietic cell protein-tyrosine phosphatase (Hcph) gene. *Cell*, 1993; 73: 1445-54.
- (56) Kozlowski M, Milnarić-Rascan I, Feng GS, Shen R, Pawson T, Simionovitch K. A. Expression and catalytic activity of the tyrosine phosphatase PTP1C is severely impaired in motheaten and viable motheaten mice. *J Exp Med*, 1993; 178: 2157-63.
- (57) Wang J, Koizumi T, Watanabe T. Altered antigen receptor signaling and impaired Fas-mediated apoptosis of B cells in Lyn-deficient mice. *J Exp Med*, 1996; 184: 831-8.
- (58) Tedder TF, Inaoki M, Sato S. The CD19-CD21 complex regulates signal transduction thresholds governing humoral immunity and autoimmunity. *Immunity* 1997; 6: 107-18.
- (59) Qian Y, Santiago C, Borrero M, Tedder TF, Clarke SH. Lupus-specific antiribonucleoprotein B cell tolerance in nonautoimmune mice is maintained by differentiation to B-1 and governed by B cell receptor signaling thresholds. *J Immunol*, 2001; 166: 2412-9.
- (60) Kozmik Z, Wang S, Dorfler P, Adams B, Busslinger M. The promoter of the CD19 gene is a target for the B-cell-specific transcription factor BSAP. *Mol Cell Biol*, 1992; 12: 2662-72.

- (61) Metes, D. *et al.* Expression of functional CD32 molecules on human NK cells is determined by an allelic polymorphism of the FcγRIIC gene. *Blood* 91, 2369-2380 (1998).
- (62) Warmerdam, P. A. M., Nabben, N. M. J. M., van de Graaf, S. A. R., van de Winkel, J. G. J. & Capel, P. J. A. The human low affinity immunoglobulin G Fc receptor IIc gene is a result of an unequal crossover event. *J. Biol. Chem.* 268, 7346-7349 (1993).
- (63) Brooks, D. G., Qiu, W. Q., Luster, A. D. & Ravetch, J. V. Structure and expression of human IgG FcRII (CD32). *J. Exp. Med.* 170, 1369-1385 (1989).
- (64) Fujiwara, K. *et al.* Determination of granulocyte-specific antigens on neutrophil Fc_γ receptor IIb by PCR-PHFA (preferential homoduplex formation assay) and gene frequencies in the Japanese population. *Vox Sang.* 77, 218-222 (1999).
- (65) Bux, J. *et al.* Characterization of a new alloantigen (SH) on the human neutrophil Fcγ receptor IIb. *Blood* 89, 1027-1034 (1997).
- (66) Warmerdam, P. A. M. *et al.* Interaction of a human FcγRIIb1 (CD32) isoform with murine and human IgG subclasses. *Int. Immunol.* 5, 239-247 (1993).
- (67) van den Herik-Oudijk, L. E., Westerdal, N. A. C., Henriquez, N. V., Capel, P. J. A. & van de Winkel, J. G. J. Functional analysis of human FcγRII (CD32) isoforms expressed in B lymphocytes. *J. Immunol.* 152, 574-585 (1994).
- (68) Hashimoto, H. *et al.* HLA antigens in Japanese patients with systemic lupus erythematosus. *Scand J. Rheumatol.* 23, 191-196 (1994).
- (69) Komata, T., Tsuchiya, N., Matsushita, M., Hagiwara, K. & Tokunaga, K. Association of tumor necrosis factor receptor 2 (TNFR2) polymorphism with susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens* 53, 527-533 (1999).

【0146】

* * 【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> OLYMPUS OPTICAL CO., LTD.

<120> Susceptive gene to systemic lupus erythematosus and use thereof

<130> A000101594

<140>

<141>

<160> 9

<170> Patent In Ver. 2.0

<210> 1

<211> 8743

<212> DNA

<213> Homo sapiens gene for CD19

<220>

<221> source

<222> (1).. (8743)

<223> /organism="Homo sapiens"
/db_xref="taxon:9606"

<220>

<221> variation

<222> (541)

<223> /replace="g"

<220>

<221> variation
 <222> (908)
 <223> /replace="t"
 <220>
 <221> variation
 <222> (1104)
 <223> /replace="t"
 <220>
 <221> variation
 <222> (1391)
 <223> /replace="a"
 <220>
 <221> variation
 <222> (2367)
 <223> /gene="CD19"
 /replace="t"
 <220>
 <221> variation
 <222> (2481)
 <223> /gene="CD19"
 /replace="c"
 <220>
 <221> variation
 <222> (2553)
 <223> /gene="CD19"
 /replace="t"
 <220>
 <221> variation
 <222> (2785)
 <223> /gene="CD19"
 /replace="g"
 <220>
 <221> variation
 <222> (7248)
 <223> /gene="CD19"
 /replace="g"
 <220>
 <221> variation
 <222> (8518)
 <223> /replace="t"
 <300>
 <303> GenBank/EMBL/DDBJ
 <308> AB052799
 <400> 1

ggatcctctc gcctcggcct cctaaagtat tgggattaca ggcatgagcc tctgtgcctg 60
 gctgtaactg acatgtttta agcaggggaa tgacatgctc tagtgaaagc cagtctgggc 120
 agctgggtag ctaatgaggg gattagagag atttgttga atgaaaggca gattgagtcc 180
 tgctactcgc cccttcatt cccttcatt catgcctcat tcttcgcct cccagccgcc 240
 tcaactggcc aaagggaagt ggaggccctg ccacctgtag ggagggtccc ctggggcttg 300
 cccacagcaa acagggaagtc acagcctggt gagatgggcc tgggaatcag ccactgagaa 360

agtgggtctc ttgggtccct gaattctttt tctgagtcct tgcagcagtg aaaaagacac 420
 agaggcacat agagagtac agagaaagag agagacagag aggagaggca tggggcagaa 480
 taagaacaga tttaggagtt agaactcctg ggttctttta aaacaatttt tcttttagag 540
 acagggtctt gttgtgtgc ccggactgga gcacagtggc tattcccagg cataatcatg 600
 gtgactgca gccttgaact cctgggtcga agcgatcctt ctacctcagc ctcccaagga 660
 cctgggacca taggcgtgta cactgtgcc tggcttttgc ctggttttta actgaggcag 720
 tatgactga gctcttaggc attaattgaa gctgtatctc attaactgag ggcttatgat 780
 gtgctggaca ctgggctaag agtgcctgac atattgtcat ttttaattct cacaacaat 840
 atttgtatag gactgttttc ttttcttttt ttttttgaa acagagtctc actctggtgc 900
 ccaggctgga gtgcagtggg gtgatctcgg ctactgcaa cctccgctc ctggtttcca 960
 gtgattctcc tgcctcagcc tctaagtag ctgggattac aggtgtgccc caccatgccc 1020
 ggctaatttt ttttttttt tttgagaagg agtctatgtg cccagcattg ttctagagca 1080
 cttgcaatta gtgtgaaca acacggtctc tactccaagg ggctcacatt cttgtgcaga 1140
 aaacagaaat gaacaaataa acacacaaga tcatttcccg tggtagtgag agctgggatg 1200
 aaaataaac agcgtggcag ggaggaggca agtgtgtga gtctggaggg ttcttgagca 1260
 atggggcctg aggcgtgacc accgccttcc tctctggggg gactgcctgc cggcccgca 1320
 gacaccatg gttgagtccc ctccaggccc ctgctgccc cagcatccc tgcgcgaagc 1380
 tgggtgcccc ggagagtctg accaccatgc cactcctcg cctcctctc ttctcctct 1440
 tctcaccac catggaagtc aggcccgagg aacctctagt ggtgaagggt gaaggtagt 1500
 ccaaagggca gaaagggaag ggattgaggc tggaaactg agttgtggct ggggtgcctt 1560
 ggctgagtaa cttaccctct ctgagcctcc attttcttat ttgtaaaatt caggaaaggg 1620
 ttggaaggac tctgccggct cctccactcc cagcttttgg agtctctctc tctataacct 1680
 ggtgtgagga gtcggggggc ttggaggctc cccccacca tgcccacacc tctctccctc 1740
 tctctccaca gaggagata acgctgtgct gcagtgcctc aaggggacct cagatggccc 1800
 cactcagcag ctgacctggt ctccggagtc cccgcttaa ccttcttaa aactcagcct 1860
 ggggtgcca ggcctgggaa tccacatgag gccctggca tcttggttt tcatctcaa 1920
 cgtctctcaa cagatggggg gcttctacct gtgccagccg gggccccct ctgagaaggc 1980
 ctggcagcct ggctggacag tcaatgtgga gggcagcggg gaggccggg ctggggcagg 2040
 ggaggaggga gagaaggag gccaccatgg acagaaggagg tccgcggcca caatggagct 2100
 ggagagaggg gctggaggga ttgaggcgga aactcggagc taggtgggca gactcctggg 2160
 gcttctggc ttcagtatga gctgcttct gtccctctac ctctactgt ctctctctc 2220
 tctcgggtc tttgtctcta tttatctctg tctttgagtc tctatctctc tccctctctc 2280
 ggggtgtctc gcatttggtt ctgggtctct tcccagggga gctgttccgg tggaatgttt 2340
 cggacctagg tggcctgggc tgtggcctga agaacaggtc ctacaggggc cccagctccc 2400
 ctccgggaa gctcatgagc cccaagctgt atgtgtgggc caaagaccgc cctgagatct 2460
 gggagggaga gcctcgtgt gtccaccga gggacagcct gaaccagagc ctacagccagg 2520
 gtatggtgat gactggggag atgccgggaa gctgggtccc agagacagag gggaggggaa 2580
 actgaaggag tgaaccctg aggatcaggc tttccttgtc ttatctctcc ctgtccaga 2640
 cctcaccatg gccctggct ccacactctg gctgtcctgt ggggtacccc ctgactctgt 2700
 gtccaggggc cccctctct ggacctgt gcacccaag gggcctaagt cattgtgag 2760
 cctagagctg aaggacgac gcccgccag agatatgtgg gtaatggaga cgggtctgtt 2820
 gttgccccg gccacagctc aagacgctgg aaagtattat gtccaccgtg gcaacctgac 2880
 catgtcattc cacctggaga tctgtctcg gccaggtaga gtttctctca actgggaggc 2940
 atctgtgtgg ggggtactgg aagaagtgga agccagtcaa tcttagattc ccccaaccg 3000
 agggctactc ccagcctcac cccaacccc aactccaca cagaacactg actccaagtc 3060
 tttctttttt ttgacagagt ctgctctgt tgcctaggct ggagtgcagt ggtgccatct 3120
 tgtcttggct cactgaacc tccgctccc aggttcaagt gattcccctg cctcagcctc 3180
 ctgagtagct gggattacag gtgcccacca ccacgcctgg ctaatttttt ttttttttt 3240
 gagacggagt cttgactgt caccaggct ggagtgcagt ggcacgatct cagctcactg 3300
 caacctccac ctccagggt caagtgttc tctgcctca gcctcccgag tagctgggat 3360

61

62

taaagcctgg ctaatttttt ttgtattttt agtagagatg gggtttcatt atgttggcca 3420
 ggctgggtctc aaactcctga cctcgtgac caccgcctc ggctcccaa agtgctggga 3480
 ttacagacat gagccacagg gccgggcaa gcctaatttt gtatttttag tagagatggg 3540
 gtttctccct gttggaccag gctggcttg aactcctgac ttcaggtgat ctgcctgcct 3600
 tggcctccca aagtactggg attacaggca taagccaccg cacctggcct agacttcaag 3660
 tctttcttcc ctgcgttcca agacactact tttctgggtc ttcacctacc attgcttgcg 3720
 cctgcccacc agcttgggtg gagtcttctt tcctcccaa ctctcactc ttggagccct 3780
 gggccctctt ctatccctg tctgcacact ttcctatttg aacttgactc tcaatggctt 3840
 ctgggtcac catgccttgg tgaacttatt ccaggctcca tactcagcca tctcctgtgc 3900
 catttgatat cccatggaca cctcaggctc aacagataca aaatcaaaact caatgtcttc 3960
 cccaagtata gtcttcttgg tggccagtg taagcagagg gcaccaccac ctgctccctc 4020
 gcccaggcta agaactggg catccttctt tttctcacc ccgtccaaca aactggtcac 4080
 agtggtctgc caattctctc tccatgcaat cctatcatgc tatcctaact gcaattcaca 4140
 aacccaaccc caactttcac tccaaacttg atccaagcaa tgtgctggat cccaactgta 4200
 accttgcaaa ctcaactctg cccttactt tgaccgtgac tatccttaat tgcagcagga 4260
 aactgatcat tatgtcccc tcaatccaca cattgcctct gactacagcc atggtttgtc 4320
 cacgatttgc tcaaagacac tgcccatgtc ctgtgccagg gtctgtgaca atccctgacc 4380
 tcctgggaca tggctcctta gagagaggag agcctttctc acagcttggg actttgagtc 4440
 tgtgtctttt ttttttctt gagacggagt ttgtctgtgg ttgccaggc tggagtgcag 4500
 tgatctcggc tcaactgaaac ctccgcctcc cgggttcaaa cgattctctt gcctcagcct 4560
 cccaagtagc tgggattaca ggcacccacc accatgccca gctaattttt ttgtattttt 4620
 agtagagatg gggtttcacc atgttggcca ggctgggtctc gaactcctga cctcaggtga 4680
 tccaccgcgc ttgcctccc aaagtgtgg gattacaggc gtcaaccacc gcgcccggcc 4740
 gactctgtgt ctgcctctg tgcctcagac ttgcggttcc ttgagatctc aggattggga 4800
 cgttaagatgc cagcctgggg tctcgtctc atagccctt cccctagta ctatggcact 4860
 ggctgtgtag gactggtggc tgggaaggtct cagctgtgac ttggcttat ctgatcttct 4920
 gcctgtgttc cttgtgggc attcttcac ttcaaaggagg tgagtcatgt cccagtgagg 4980
 tctgtccaaa cctactcca tcttcccag gataagccgg ctctggccag tctgacaacc 5040
 atctttcttt cctccatcc ctcccttcaa gacccagaa tctgttctc cccagtcttc 5100
 ctctagcctc cctcaaaact cccaagcctc ttgcaatttt tttttttttt ttgagacagg 5160
 gtctcattct gtcacccag ctggagtga gtggcacaat ctgagctcac tgtaacctct 5220
 gcctcccagg cttaagtgat tcttgtgctt cagcctcccg agtacctggg actacaagtg 5280
 tatgccacca caccggcca attttttata ttttagtag agacgaggtt tcaccatggt 5340
 ggccagactg gtctcgaact cttgacctca aatgatccgc ccacctcggc ctccaaaagt 5400
 gctgggatta caggcacgag ccaccgcgc cgtccgcctc gcaatttgaa ctctgtctc 5460
 ctttgttgaa ccaagtgacc tcccagcac ctggcccac aaatctcac cctgccaagc 5520
 agcccctct ctgatcacgc ctttaactc ccaccagccc tggctctgag gaggaaaaga 5580
 aagcgaatga ctgacccac caggaggtaa tgcaaccagt gcaccccgcg gtaacaccct 5640
 ccaccttcac tttatgcctt gcacttactg tttctctgc ccagggggtc tttgctccgt 5700
 ctctactgtt tcaaatctg cccaacctca aagcccagct ccaaagctac ctctctgtg 5760
 aagaactcct tggaatgat catctcagac tctctattg gctgtcccag cacaagtgat 5820
 cacgtttaac ttctgaaggc ctggacagaa tcttgagtgg gtccgccatt ccattccaag 5880
 tcggccctca ccgtgcactt cctcttctcc cgccagattc ttcaaagtga cgctccccc 5940
 aggaagcggg cccagaacc agtacgggaa cgtgtgtct ctccccacac ccacctcagg 6000
 cctcggttaag aggcaccgac cctccagcct atagctccgc ccagatccg gggctccacc 6060
 cccactctcc tcatccctcc aatccgctgt gcgccaagcc ttctggagct cggaactccg 6120
 cccccggggc ggggagtcgc gccagctat gagccccgc tctagaacca gacccgcct 6180
 ccagggtca gagccacgac cccaggacc agagcctgaa gtcgtaatca agagcagaac 6240
 ttcgcccag aactgaaggc ctggcccta gatitagatt ccgcccagg gtccaaggcc 6300
 gggttcctag acccagagtc cattcgcaga gccaaaaca tctcttccc gtgccccgc 6360

63

64

gcgcggagcc ttagccttga ccgcccccat ctcttctgac cccgtcttac aatgccctc 6420
 tcaccaggac gcgcccagcg ttgggcccga ggcctggggg gcactgcccc gtcttatgga 6480
 aacccgagca gcgacgtcca ggccgatgga gccttggggg cccggagccc gccgggagt 6540
 ggtgaatgac tgggagaggg aagggtcgtt ccccatatgg agggggttgg agcggctgt 6600
 ggcccgaata gtggactggg ccctggagga gagggggcat gactcgggtc cccatcccca 6660
 tccccaaacc cccaggccca gaagaagagg aaggggaggg ctatgaggaa cctgacagt 6720
 agggaggact cgagttctat gagaacgact ccaaccttgg gcaggaccag ctctccagg 6780
 gtaaggctgc cctccccgt ggccccccac ctctgcggtg gcctgtggac tccatggac 6840
 accctctctt ctacaccaga tggcagcggc tacgagaacc ctgaggatga gccctgggt 6900
 cctgaggatg aagactcctt ctccaacggt aacttggggc ctttgtggga cctcagagac 6960
 ttaggtgtaa ttgcagcgt gtgacactcc tagaaggga tccctggagt tctctctt 7020
 ctgccacagc tgagtcttat gagaacgagg atgaagagct gaccagccg gtcgccagga 7080
 caatgggtgt gtgtgaggat ggcaacagtc caggggggag gcggaggaca cctggaggcc 7140
 agggaggaata gtaacctccc tcttccctt ccagacttcc tgagccctca tgggtcagcc 7200
 tgggacccca gccgggaagc aacctccctg ggtgagagat gctttcaatc agactgcctt 7260
 gccagcttg ggtgacctg cctcagctct gacaccagat ccaacttga cctgacctg 7320
 accccaacc cgaaccaat cctgtgactc ctctacctc aacctgagc cccatcccc 7380
 atctgagcc ccatcccca tctgacccc caatatctac cccctcccta actgtgaata 7440
 tcaacaccga tccaatgca gtatcagcct ggacttgatc tccacctcac ctcagcccca 7500
 gtgcagacct caacttgac cccagcttac tctgcagctt cttcatgact ctgactccga 7560
 ctccctccag tttcttctt tctttttt tttttttgag acggagtctc cctctgttc 7620
 ccaggctgga gtgcagttgc cacctctgcc tcttaggttc aagcgattct catgcctcag 7680
 cctcctgagt agctgggatt atagacgtt gccaccacac ctggctaatt tttgtattt 7740
 cagtagagac agggtttcgc catgttgcc agactggtct ccaactcctg gcctctagt 7800
 atctgccgc ctttgcttc ccaagtgtc gggattacag gcatgagcca ccacgccag 7860
 cccagtctg tcttgaccc cttccttagc cataatctaa cccatatcta accctgaccc 7920
 tacagctaac tggggcccca aactcaatgc taaccaaac acccttccc agcacagcat 7980
 gggtaatgct cctcacctc ctctgccct cagtcttct ccttaccgta ggtgtactt 8040
 cccatgccct agcctccat tctccatccc ccgccaagc aggtcccag tctatgagg 8100
 atatgagagg aatcctgtat gcagccccc agctccgctc cattcggggc cagcctggac 8160
 ccaatcatga ggaaggtggg tgcttctgcc gctgtcccct gctgtcccct gggctgactt 8220
 tgcttccag cctacttcca gtgccacca tgttctctc ctccctggc ctatccagat 8280
 gcagactct atgagaacat ggataatccc gatggggcag acccagcctg gggaggagg 8340
 ggccgcatgg gcacctggag caccagggtg tctcaggtg gccaggtgag ctgggactgc 8400
 ccctagggaa agcggggagg gagggagata ggcacggatg gcagtggctg ctggcttca 8460
 gggagggaga gggaacaggg ttcttagggc ctggtgggca gggggaggac tgcaggatcc 8520
 ctccccatca ccgtttctc tgcatagcct ggatctctc aagtcccaa gattcacacc 8580
 tgactctgaa atctgaagac ctgcagcaga tgatccaac ctctggagca atgttgctta 8640
 ggatgtgtgc atgtgtgtaa gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtatacat gccagtga 8700
 ctccagctc ctttgtatt ctttaataa actcaatgag ctc 8743

<210> 2

<211> 252

<212> DNA

<213> Homo sapiens gene for CD19

<220>

<221> source

<222> (1)..(252)

<223> /organism="Homo sapiens"

/db_xref="taxon:9606"

/chromosome="16"

65

66

/map="16p11.2"

<220>

<221> satellite

<222> (194)..(213)

<223> /note="microsatellite GT repeat variation 5"

/rpt_type=tandem

/rpt_unit=gt

<300>

<303> GenBank/EMBL/DDBJ

<308> AB052818

<400> 2

agagggaaca gggttcctag ggcctggtgg gcagggggag gactgctgga cccctcccca 60
 tcaccgtttc ttctgcatag cctggatctc ctcaagttcc caagattcac acctgactct 120
 gaaatctgaa gacctcgagc agatgatgcc aacctctgga gcaatgttgc ttaggatgtg 180
 tgcattgtgtg taagtgtgtg tgtgtgtgtg tgtatacatg ccagtgcacac ttccagttccc 240
 ctttgtattc ct 252

<210> 3

<211> 258

<212> DNA

<213> Homo sapiens gene for CD19

<220>

<221> source

<222> (1)..(258)

<223> /organism="Homo sapiens"

/db_xref="taxon:9606"

/chromosome="16"

/map="16p11.2"

<220>

<221> gene

<222> (194)..(219)

<223> gene="CD19"

<220>

<221> satellite

<222> (194)..(219)

<223> /gene="CD19"

/note="microsatellite GT repeat variation 1"

/rpt_type=tandem

/rpt_unit=gt

<300>

<303> GenBank/EMBL/DDBJ

<308> AB052814

<400> 3

agagggaaca gggttcctag ggcctggtgg gcagggggag gactgctgga cccctcccca 60
 tcaccgtttc ttctgcatag cctggatctc ctcaagttcc caagattcac acctgactct 120
 gaaatctgaa gacctcgagc agatgatgcc aacctctgga gcaatgttgc ttaggatgtg 180
 tgcattgtgtg taagtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgta tacatgccag tgacacttcc 240
 agtccccttt gtattcct 258

<210> 4

67

68

```

<211> 260
<212> DNA
<213> Homo sapiens gene for CD19
<220>
<221> source
<222> (1)..(260)
<223> /organism="Homo sapiens"
      /db_xref="taxon:9606"
      /chromosome="16"
      /map="16p11.2"
<220>
<221> satellite
<222> (194)..(221)
<223> /note="microsatellite GT repeat variation 2"
      /rpt_type=tandem
      /rpt_unit=gt
<300>
<303> GenBank/EMBL/DDBJ
<308> AB052815
<400> 4
agagggaaca gggttcctag ggcctggtgg gcagggggag gactgctgga cccctcccca 60
tcaccgtttc ttctgcatag cctggatctc ctcaagtccc caagattcac acctgactct 120
gaaatctgaa gacctcgagc agatgatgcc aacctctgga gcaatgttgc ttaggatgtg 180
tgcatgtgtg taagtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tatacatgcc agtgacactt 240
ccagtccctt ttgtattcct                                     260
<210> 5
<211> 262
<212> DNA
<213> Homo sapiens gene for CD19
<220>
<221> source
<222> (1)..(262)
<223> /organism="Homo sapiens"
      /db_xref="taxon:9606"
      /chromosome="16"
      /map="16p11.2"
<220>
<221> gene
<222> (194)..(223)
<223> /gene="CD19"
<220>
<221> satellite
<222> (194)..(223)
<223> /gene="CD19"
      /note="microsatellite GT repeat variation 3"
      /rpt_type=tandem
      /rpt_unit=gt
<300>
<303> GenBank/EMBL/DDBJ
<308> AB052816

```

69

70

```

<400> 5
agagggaaca gggttcctag ggcttggtgg gcagggggag gactgctgga ccctcccca 60
tcaccgttc ttctgcatag cctggatctc ctcaagtcac caagattcac acctgactct 120
gaaatctgaa gacctcgagc agatgatgcc aacctctgga gcaatgttgc ttaggatgtg 180
tgcattgtg taagtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtatcatg ccagtgcac 240
ttccagtcac cttgtattc ct 262
<210> 6
<211> 268
<212> DNA
<213> Homo sapiens gene for CD19
<220>
<221> source
<222> (1)..(268)
<223> /organism="Homo sapiens"
      /db_xref="taxon:9606"
      /chromosome="16"
      /map="16p11.2"
<220>
<221> gene
<222> (194)..(229)
<223> /gene="CD19"
<220>
<221> satellite
<222> (194)..(229)
<223> /gene="CD19"
      /note="microsatellite GT repeat variation 4"
      /rpt_type=tandem
      /rpt_unit=gt
<300>
<303> GenBank/EMBL/DDBJ
<308> AB052817
<400> 6
agagggaaca gggttcctag ggcttggtgg gcagggggag gactgctgga ccctcccca 60
tcaccgttc ttctgcatag cctggatctc ctcaagtcac caagattcac acctgactct 120
gaaatctgaa gacctcgagc agatgatgcc aacctctgga gcaatgttgc ttaggatgtg 180
tgcattgtg taagtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgta tacatgccag 240
tgacacttcc agtccccttt gtattcct 268
<210> 7
<211> 369
<212> DNA
<213> Homo sapiens gene for FCGR2B exon4,5
<220>
<221> variation
<222> (221)
<223> /replace="a"
<220>
<221> variation
<222> (304)
<223> /replace="c"
<300>

```

<303> GenBank/EMBL/DDBJ

<308> AB050934

<400> 7

agtggtggt gctccagacc cctcacctgg agttccagga gggagaaacc atcgtgctga 60
ggtgccacag ctggaaggac aagcctctgg tcaaggtcac attcttccag aatggaaaat 120
ccaagaaatt ttcccgttcg gatcccaact tctccatccc acaagcaaac cacagtcaca 180
gtggtgatta cactgcaca ggaacatag gctacacgct atactcatcc aagcctgtga 240
ccatcactgt ccaagctccc agctcttcac cgatggggat cattgtggct gtggtcactg 300
ggactgtgt agcgccatt gttgctgctg tagtggcctt gatctactgc aggaaaaagc 360
ggatttcag 369

<210> 8

<211> 567

<212> DNA

<213> Homo sapiens gene for FCGR2B exon5 & flanking intron

<220>

<221> variation

<222> (95)

<223> /replace="t"

<220>

<221> variation

<222> (100)

<223> /replace="c"

<220>

<221> variation

<222> (134)

<223> /replace="t"

<220>

<221> variation

<222> (148)

<223> /replace="t"

<220>

<221> variation

<222> (153)

<223> /replace="g"

<220>

<221> variation

<222> (251)

<223> /replace="t"

<220>

<221> variation

<222> (328)

<223> /replace="c"

<220>

<221> variation

<222> (386)

<223> /replace="c"

<220>

<221> variation

<222> (468)

73
 <223> /replace="a"
 <220>
 <221> variation
 <222> (477)
 <223> /replace="g"
 <300>
 <303> GenBank/EMBL/DDBJ
 <308> AB062416
 <400> 8
 aaggctgtgc tccatagagt aatgatgcct ccagctatgc gaggctttgg gcccaccctt 60
 cccactgccc ctgagggcta aggggagccc ttccttctgc tcctgcctgc tcaccagtgt 120
 gcctttatta gtttgggtga gaaaccttgg taggcaggag gcataagtcc agccacagaa 180
 accctgtgca gatgaggctg gggatgtagt gagtgtgca gaagtgtg actcagacac 240
 agaagagctt tgggtgacaa gcaactaggac atagcattgg atggggggga ggtgggacaa 300
 ggagagtact gcctgtcctg atgtctgcct tccctagctc ccagctcttc accgatgggg 360
 atcattgtgg ctgtggtcac tgggactgct gtagcgcca ttgttctgc tgtagtggcc 420
 ttgatctact gcaggaaaa gcggatttca ggttttagc tcctccagc ccctttggtt 480
 atcagtttcc acttgccca gccctaacc ccagacattg ccagaatccc tctctttggg 540
 ctagatacac attcagatct aggcccg 567
 <210> 9
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens gene for FCGR2B exon7
 <400> 9
 cccaactttg tcagcctcat

20

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の1態様であるSLE発症危険率予測装置の構成図。

【図2】本発明において用いるスコアテーブルの例を示す図。

【図3】本発明の1態様において使用する処理フローを示す図。

【図4】本発明の1態様であるSLE発症危険率予測装置の構成図。

【図5】ヒトCD19遺伝子のゲノム配置および日本人において検出された変異を示す図。

* 【図6】FCFR2B遺伝子のcDNA構造とネステッドPCR戦略を示す図。

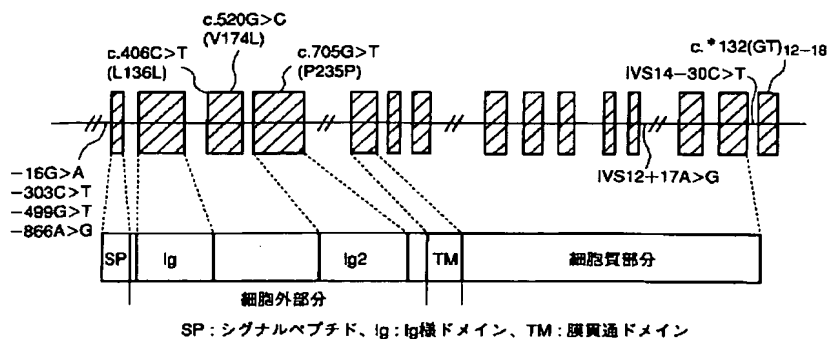
【図7】FCGR2B-232I/T多型の代表的なSCPパターンを示す電気泳動写真。

30 【図8】2遺伝子座解析により得られたFCGR2Bの主な役割を示す図。

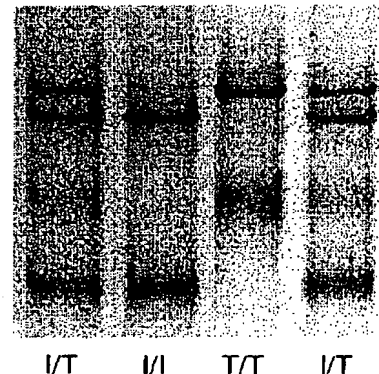
【符号の説明】

1. ゲノムDNAサンプル精製装置 2. 遺伝子型決定手段 3. 入力手段
 4. 表示装置 5. CPU 6. RAM 7. 画像処理部 8. フィル 11. バス線

【図5】

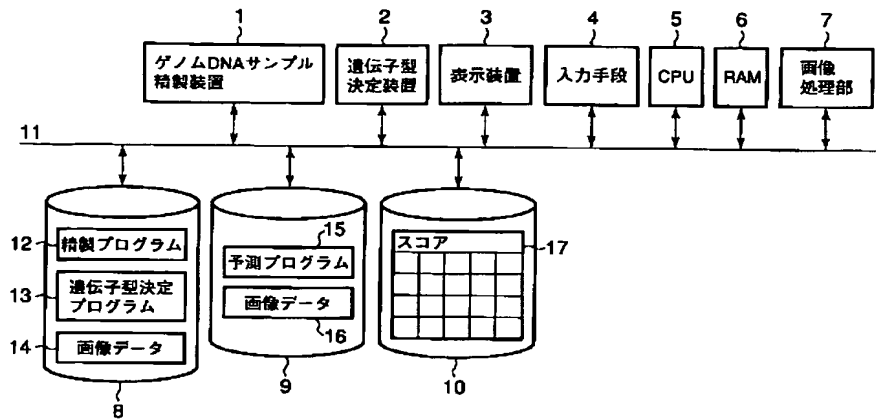


【図7】



【図1】

SLE発症危険率予測装置の構成



【図2】

スコアテーブル

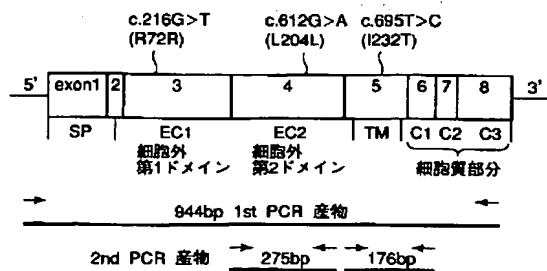
多型No	遺伝子名	遺伝子座	遺伝子型	スコア
1	CD19	C.705	T	-1
			G	0
2	CD19	IVS14-30	T	-1
			C	0
3	CD19	C.*132	(GT)反復15回未満	0
			(GT)反復15回以上	1
4	FCGR2B	C.695	C+C	1
			T+T, T+C	0
5	HLA	DRB1*1501	有	1
			無	0

(a)

スコア	結果
-1	0
0	
-1	0
0	
0	1
1	
1	1
0	
1	1
0	
スコア合計	3

(b)

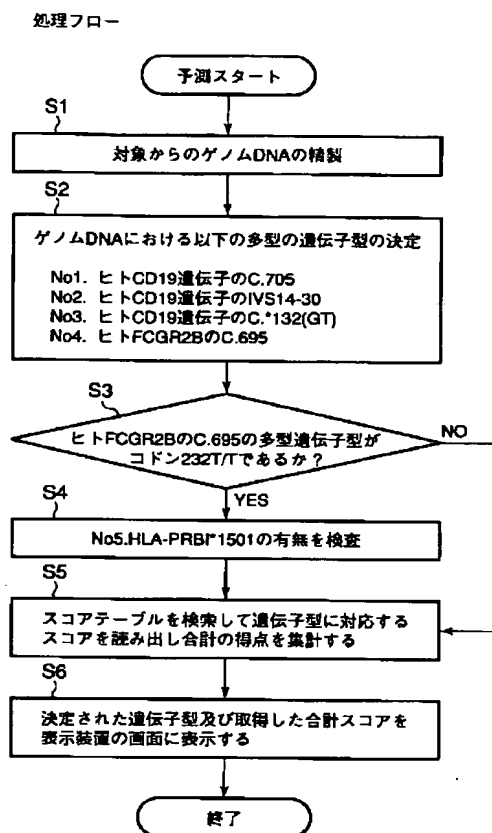
【図6】



【図8】

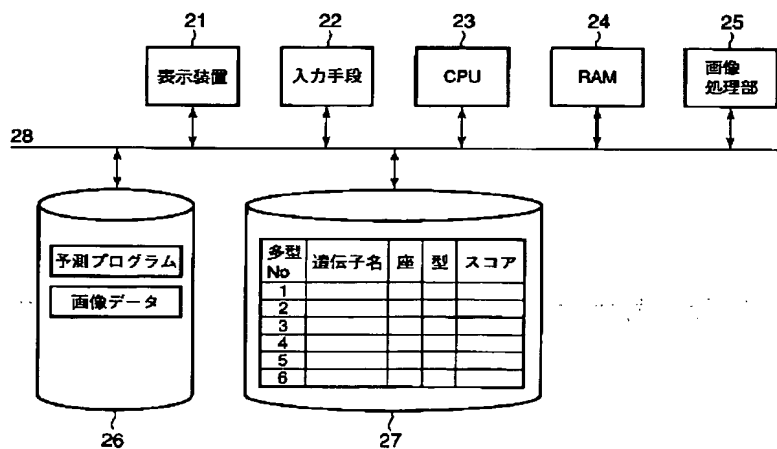
FCGR3B FCGR2B	NA1/1 SLE 健康人	NA1/2 SLE 健康人	NA2/2 SLE 健康人
232I/I	20(26.7) 31(33.0) OR ^a : 1	16(21.3) 26(27.7) OR: 0.95 ^b	2(2.7) 0(0.0)
232I/T	2(2.7) 0(0.0)	18(24.0) 24(25.5) OR: 1.16 ^c	4(5.3) 8(8.5) OR: 0.78 ^d
232T/T	0(0.0) 0(0.0)	2(2.7) 0(0.0)	11(14.7) 5(5.3) OR: 3.41 ^e

【図3】



【図4】

SLE予測装置の例の構成



フロントページの続き

F ターム(参考) 4B024 AA11 AA19 CA01 CA04 CA06
CA12 CA20 HA11
4B029 AA07 AA23 BB20 FA15
4B063 QA13 QA17 QA19 QQ02 QQ42
QQ53 QR08 QR14 QR32 QR35
QR40 QR42 QR62 QS16 QS25
QS36 QS39 QX01 QX10